

ARTÍCULO ORIGINAL

Detección de un complejo clonal con el genotipo de *Brucella abortus* biovariedad 2 como fundador en aislamientos de *B. abortus* de Argentina

Daiana Hollender^{a,*}, Sandra B. Conde^b, Eduardo Salustio^c y Luis E. Samartino^d

^a Laboratorio de Brucella, Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Castelar, Las Cabañas y Nicolás Repetto, Hurlingham (1686), Buenos Aires, Argentina

^b AER Lobos - INTA, EEA Pergamino, Centro Regional Buenos Aires Norte, Pergamino, Provincia de Buenos Aires, Argentina

^c Falleció 7/12/11.

^d Laboratorio de Brucelosis, Instituto de Patobiología, CICVyA, INTA Castelar, Las Cabañas y Nicolás Repetto, Hurlingham (1686), Buenos Aires, Argentina^o

Recibido el 27 de mayo de 2013; aceptado el 27 de noviembre de 2013

PALABRAS CLAVE

Brucella;
MLVA;
Tipificación molecular;
Epidemiología

Resumen

Brucella abortus es el agente causal de la brucelosis bovina, enfermedad zoonótica que se encuentra ampliamente distribuida en el mundo. Actualmente existen ocho biovariedades de *B. abortus*. En Argentina se encuentra con mayor frecuencia la biovariedad 1, pero también se suele aislar la biovariedad 2, que es más patogénica que la anterior. Resulta necesario contar con métodos de tipificación que tengan la resolución suficiente para permitir el seguimiento epidemiológico de los brotes de brucelosis y de los programas de control de la enfermedad. Debido a la gran homogeneidad genética que existe entre las distintas especies del género *Brucella*, ha sido dificultoso el desarrollo de herramientas moleculares para realizar el análisis epidemiológico de los aislamientos. La publicación del genoma de varias especies de *Brucella* facilitó el diseño de estas herramientas. El objetivo del presente trabajo fue emplear un esquema de análisis multilocus de VNTR en aislamientos de Argentina obtenidos en nuestro laboratorio. De los 56 aislamientos analizados se obtuvieron 47 perfiles genotípicos diferentes. El empleo de este esquema permitió asignarles a dichos aislamientos la biovariedad correspondiente. A través del análisis goeBURST se pudo relacionar a todos los genotipos entre sí, y además, proponer al genotipo de la biovariedad 2 como fundador.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

^o Lugar de trabajo de todos los autores durante la realización del trabajo.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: dhollender@cnia.inta.gov.ar (D. Hollender).

KEYWORDS

Brucella;
MLVA;
Molecular typing;
Epidemiology

Detection of a clonal complex with *Brucella abortus* biovar 2 genotype as founder in *B. abortus* isolates from Argentina

Abstract

Brucella abortus is the causative agent of bovine brucellosis, a worldwide zoonosis. Up to date, eight biovars of *B. abortus* have been described. In Argentina, biovar 1 is the most frequently isolated. However, biovar 2, which is more pathogenic than biovar 1, is also found. Molecular methods for subtyping isolates are necessary for allowing epidemiological surveillance and control of eradication programs. Due to the genetic homogeneity of the genus *Brucella*, the development of molecular typing tools has been difficult. The publication of microorganism genomes facilitates the design of this approach. The aim of this work was to employ a Multiple Locus VNTR Analysis (MLVA) scheme for strains from Argentina isolated in our laboratory. From the 56 isolates analyzed, 47 different genotypic profiles were obtained. All the strains typed as biovar 2 showed the same profile. This scheme allowed assigning each isolate to the biovar it belongs to. All the genotypes were related using the goeBURST analysis and biovar 2 was proposed as founder.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Introducción

La brucelosis es una zoonosis que se encuentra principalmente en América Latina, en la región del Mediterráneo en Europa, en el oeste de Asia y en gran parte del territorio africano. Esta enfermedad está causada por bacterias del género *Brucella*, microorganismo gram negativo, intracelular facultativo. Se reconocen varias especies dentro del género, siendo *Brucella abortus* la causante de la brucelosis bovina.

Existen ocho biovariedades descritas de *B. abortus*¹. En Argentina se encuentra con mayor frecuencia la biovariedad 1, pero también se suele aislar de animales y humanos¹³ la biovariedad 2¹⁹. Esta biovariedad se ha observado en infecciones naturales en bovinos, asociada a la «tormenta de abortos» que provoca en los animales preñados infectados, y al nacimiento de terneros que mueren a las horas y también de «natimortos», es decir, de terneros que nacen en término pero muertos. En infecciones experimentales en cobayos, *B. abortus* biovariedad 2 produjo lesiones granulomatosas mucho más graves que la biovariedad 1 (Samartino L, comunicación personal). Además del fuerte impacto en la salud pública, la infección por *Brucella* genera grandes pérdidas económicas²⁰.

Es sumamente útil contar con métodos de tipificación que tengan la resolución suficiente para permitir un seguimiento epidemiológico de los brotes de brucelosis y de los programas de control de la enfermedad. El desarrollo de herramientas moleculares para identificar y tipificar aislamientos del género *Brucella* ha sido muy laborioso debido a la falta de polimorfismo dentro del género. Las especies de *Brucella* presentan una homología intraespecífica mayor del 80 % por estudios de hibridación ADN-ADN²³, una similitud de secuencia mayor del 98 % por genómica comparativa⁹, y la secuenciación del ARNr 16S muestra un 100 % de identidad entre todas las especies de *Brucella*⁷.

Dada la homogeneidad genética que se observa dentro del género *Brucella*, es de esperar que marcadores basados en secuencias génicas no provean la resolución requerida para

hacer un seguimiento epidemiológico. La presencia de unidades repetidas en tándem, que varían en su número dentro de regiones no codificantes del genoma, surgen de errores durante la replicación¹² o de eventos de recombinación desiguales¹⁸. Como consecuencia, estos lugares puntuales presentan una alta tasa de mutación, lo que los hace muy útiles a la hora de buscar polimorfismos que permitan tipificar especies bacterianas con genomas muy conservados, como *Bacillus anthracis*¹⁰ y varias especies de micobacterias¹⁵.

La secuenciación de los genomas facilitó el desarrollo de nuevos métodos para tipificar *Brucella*, como tipificación multilocus de secuencias [*Multi Locus Sequence Typing* (MLST)] y análisis multilocus de repeticiones en tándem de número variable [*Multiple Locus Variable Number Tandem Repeats* (VNTR) Analysis (MLVA)].

El diseño racional de un esquema de tipificación mediante MLVA debería incluir marcadores con diferentes niveles de diversidad y poder discriminatorio. Así, se podrían agrupar los marcadores en dos conjuntos: uno compuesto por marcadores muy variables, que permitan diferenciar a las distintas cepas, y otro formado por marcadores más estables, con baja diversidad, menos discriminatorios, para diferenciar a nivel especie. Desde una perspectiva práctica, los primeros resultarían muy útiles a la hora de realizar un estudio epidemiológico en un brote puntual de la enfermedad, mientras que los segundos permitirían relacionar aislamientos en una escala regional o global. Ejemplos de este tipo de diseño se pueden encontrar en los trabajos de Whatmore *et al.*²⁴ y Le Flèche *et al.*¹¹.

La utilidad de los MLVA en *Brucella* está bien documentada. García-Yoldi *et al.*⁶ compararon MLVA con otros métodos basados en PCR para tipificar *B. suis*. Los resultados obtenidos con las distintas metodologías fueron concordantes y además, los MLVA permitieron realizar inferencias sobre la relación epidemiológica de las cepas. Empleando el mismo esquema de 10 *loci* VNTR, Beja-Pereira *et al.*² sugirieron que un brote de brucelosis bovina en el área del Parque Yellowstone (Estados Unidos) se originó a partir de renos (*Cervus elaphus*) y no de bisones (*Bos bison*), como se pen-

saba hasta ese momento. Higgins *et al.*⁸, por su parte, realizaron un estudio epidemiológico de *B. abortus* aislada de ganado (*Bos primigenius*), renos y bisones; esto les permitió tomar decisiones sobre el manejo de estas tres especies que conviven en la misma área. Lucero *et al.*¹⁴ describieron dos brotes de brucelosis humana por consumo de queso sin pasteurizar en Argentina (una familia de San Juan y otra de Buenos Aires), y mediante MLVA determinaron que los aislamientos obtenidos a partir de las personas infectadas de cada familia constituyen dos *clusters* genéticos diferentes.

Bricker *et al.*³ describieron un esquema de MLVA que llamaron HOOOF-Prints, basado en la repetición en tándem de una secuencia de 8 nucleótidos que se encuentra en ocho regiones del genoma. En un trabajo posterior, Bricker *et al.*⁴ evaluaron el desempeño de los HOOOF-Prints en cepas de *B. abortus* aisladas en Estados Unidos a través del análisis de características del método como tipabilidad, reproducibilidad, estabilidad, poder discriminatorio y concordancia epidemiológica y los compararon con otros métodos de tipificación obteniendo resultados que superan el valor mínimo sugerido por el Grupo Europeo de Estudio de Marcadores Epidemiológicos [European Study Group on Epidemiological Marker (ESGEM)]²¹. En 2009, Valdezate *et al.*²² reportaron el surgimiento de un linaje clonal de *B. abortus* biovariedad 3 en aislamientos clínicos en España, los HOOOF-Prints les permitieron revelar la relación genética entre dichos aislamientos.

El objetivo de este trabajo fue genotipificar aislamientos de *B. abortus* en Argentina utilizando un esquema de MLVA combinado, el cual incluye los HOOOF-Prints y algunos de los *loci* VNTR descritos por Whatmore *et al.*²⁴.

Materiales y métodos

Aislamientos, tipificación bioquímica y preparación del templado de PCR

Se utilizaron las cepas de *B. abortus* conservadas en el cepario del Laboratorio de Brucelosis del Instituto de Patobiología del CICVyA de INTA. De las cepas incluidas en este estudio, 37 fueron aisladas por personal del laboratorio a partir de muestras de origen bovino, 12 fueron enviadas para su tipificación, en tanto que se desconoce la procedencia de 9 de ellas. Las cepas utilizadas en este trabajo se presentan en la tabla 1.

La tipificación de cada cepa se realizó siguiendo las técnicas habituales¹, según se detalla a continuación. Crecimiento en presencia de colorantes: las bacterias se sembraron en agar triptosa en presencia de diluciones 1: 50 000 de fucsina y 1: 25 000 y 1: 50 000 de tionina. Producción de H₂S: las bacterias se sembraron en tubos con agar triptosa en pico de flauta, entre el tubo y el tapón se colocó una tira de papel seca, previamente embebida en una solución al 10 % de acetato de plomo. Las bacterias se dejaron crecer durante 4 días, con un cambio diario de la tira del papel indicador, en presencia de H₂S dicho papel se oscurece. Prueba de ureasa: al medio de Christensen suplementado con urea se le agregó una ansada de cada cepa y se observó el cambio de color del medio, de amarillo a rosa. Cada cepa se sembró en agar triptosa (Difco, Sparks, EE.UU.) en pico

de flauta y se dejó crecer en estufa a 37 °C durante 48 h. Los cultivos de las cepas de la biovariedad 2 se suplementaron con 10 % de suero bovino negativo proveniente de animales de establecimientos libres de brucelosis y se dejaron crecer en atmósfera con 5 % de CO₂. Luego las estrías se resuspendieron en 5 ml de NaCl 5 %. Las suspensiones se inactivaron a 82 °C durante 60 min. Se sembró una alícuota en agar triptosa según los requerimientos de cada cepa para verificar su inactivación y se dejó crecer en estufa a 37 °C durante 72 h. Esta suspensión se utilizó como templado en las reacciones de PCR.

Amplificación por PCR

Las reacciones de PCR se realizaron empleando la enzima *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, CA) en un termociclador Hybaid Px2 (Thermo Scientific, EE.UU.). Los oligonucleótidos utilizados (tabla 2) se adquirieron en Operon (EE.UU.). La amplificación de los HOOOF-Prints se realizó en las siguientes condiciones: 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 0,25 mM de cada dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 μM de cada oligonucleótido, 0,6 unidades de *Taq* y 3 μl de templado. El programa de ciclado comprendió la siguiente secuencia: 94 °C durante 2 min, 32 ciclos de 94 °C, 5 s; 55 °C, 20 s y 72 °C, 1,5 min; con una extensión final a 72 °C durante 5 min. La amplificación de los VNTR se realizó en las siguientes condiciones: buffer de la enzima 1X, 0,25 mM de cada dNTP, 2 mM MgCl₂, 0,2 μM de cada oligonucleótido, 0,6 unidades de *Taq* y 1 μl de templado. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 95 °C, 5 min; 30 ciclos de 95 °C, 30 s; 55 °C, 30 s y 72 °C, 1 min; con una extensión final a 72 °C durante 10 min.

De los 13 *loci* VNTR descritos por Whatmore *et al.*²⁴, se amplificaron VNTR 7, 14, 21, 24, 26 y 27. Los productos de amplificación se diluyeron 1:10 con agua y 5 μl de la dilución se sembraron en geles de poliacrilamida al 8 % (Invitrogen, CA). A los geles se les agregó 1,5 % de glicerol para disminuir la difusión y evitar que se sequen por evaporación durante su conservación. Los geles de poliacrilamida se tiñeron con plata según el siguiente procedimiento: fijación con una solución con 10 % de etanol (Merck, Argentina) y 0,5 % de ácido acético (Anedra, Argentina) durante 10 min, tinción con una solución al 0,2 % de AgNO₃ (Merck, Argentina) durante 10 min, un lavado con agua durante 5 min, revelado con una solución con 3 % de NaOH (Mallinckrodt, EE.UU.) y 0,6 % de formol, hasta aparición de las bandas, y fijación durante 5 min con la solución del primer paso. Luego se colocaron entre dos hojas de papel celofán y se dejaron secar a temperatura ambiente. Para determinar el tamaño de las bandas se utilizaron los marcadores de 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, CA) y O'RangeRuler 20 bp DNA Ladder (Fermentas, Vilna, Lituania).

Análisis de la relación genética

Con la herramienta V-DICE disponible en el sitio web de HPA (<http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl>) se determinó el poder de discriminación, utilizando el índice de discriminación de Hunter-Gaston (IDHG). El análisis de la relación genética entre los aislamientos se realizó mediante el algoritmo goeBURST, utilizando el software Phylviz (<http://www.phylviz.net/wiki/>)⁵.

Tabla 1 Características de las cepas utilizadas en este estudio

Aislamiento	Biovariedad	Aislado de	Procedencia	Año
S19	1	vacunal	SENASA	-
RB51	1	vacunal	Virginia Tech	-
2308	1	referencia	Centro Panamericano de Zoonosis	1992
Bab1 1	1	leche	9 de Julio, Buenos Aires	1999
Bab1 2 ^a	1	leche	V. Mackena, Córdoba	2002
Bab1 3	1	leche	Bell Ville, Córdoba	2004
Bab1 4	1	leche	Anguil, La Pampa	1994
Bab1 5	1	leche	25 de Mayo, Buenos Aires	1999
Bab1 6	1	cepa	Río Cuarto, Córdoba	2001
Bab1 7	1	leche	Tío Pujío, Córdoba	2002
Bab1 8	1	leche	Anguil, La Pampa	s.i.
Bab1 9	1	leche	V. Mackena, Córdoba	2002
Bab1 10	1	cepa	Mercedes, Corrientes	2002
Bab1 11	1	ternero	Buenos Aires	2003
Bab1 12	1	leche	Lobos, Buenos Aires	2007
Bab1 13	1	leche	9 de Julio, Buenos Aires	1999
Bab1 14	1	cepa	Río Cuarto, Córdoba	2001
Bab1 15	1	leche	Lobos, Buenos Aires	2007
Bab1 16	1	cepa	Santa Fe	2000
Bab1 17	1	pulmón feto	Mercedes, Buenos Aires	2005
Bab1 18 ^a	1	leche	V. Mackena, Córdoba	2002
Bab1 19 ^a	1	leche	25 de Mayo, Buenos Aires	1999
Bab1 20	1	leche	Buenos Aires	1998
Bab1 21	1	leche	Suipacha, Buenos Aires	1992
Bab1 22	1	feto bovino	Santa Rosa, La Pampa	2001
Bab1 23	1	leche	Chivilcoy, Buenos Aires	1992
Bab1 24	1	leche	Morrison, Córdoba	1996
Bab1 25	1	cepa	Río Cuarto, Córdoba	1997
Bab1 26	1	leche	Morrison, Córdoba	1996
Bab1 27	1	s.i.	s.i.	s.i.
Bab1 28	1	cepa	Río Cuarto, Córdoba	2001
Bab1 29	1	s.i.	Tandil, Buenos Aires	s.i.
Bab1 30	1	leche	s.i.	s.i.
Bab1 31	1	cepa	Corrientes	2001
Bab1 32	1	cepa	Río Cuarto, Córdoba	2001
Bab1 33 ^a	1	cepa	Río Cuarto, Córdoba	2001
Bab1 34	1	feto bovino	Corrientes	2002
Bab1 35	1	cepa	Río Cuarto, Córdoba	2001
Bab1 36	1	leche	Suipacha, Buenos Aires	s.i.
Bab1 37	1	leche	Bell Ville, Córdoba	2004
Bab1 38	1	leche	Chivilcoy, Buenos Aires	1992
Bab1 39 ^a	1	leche	Bell Ville, Córdoba	2004
Bab1 40	1	leche	Morrison, Córdoba	1996
Bab1 41	1	cepa	Río Cuarto, Córdoba	2001

Tabla 1 Características de las cepas utilizadas en este estudio (*Continuación*)

Aislamiento	Biovariedad	Aislado de	Procedencia	Año
Bab1 42	1	feto bovino	Mercedes, Buenos Aires	2005
Bab1 43	1	leche	V. Mackena, Córdoba	2002
Bab1 44	1	leche	Buenos Aires	1998
Bab1 45	1	s.i.	s.i.	s.i.
Bab1 46	1	s.i.	s.i.	s.i.
Bab1 47	1	s.i.	s.i.	s.i.
Bab1 48	1	s.i.	s.i.	s.i.
Bab1 49	1	s.i.	s.i.	s.i.
Bab1 50	1	s.i.	s.i.	s.i.
Bab1 51	1	s.i.	s.i.	s.i.
Bab2 1	2	cepa	s.i.	1994
Bab2 2	2	placenta	Luján, Buenos Aires	1993
Bab2 3	2	leche	Los Toldos, Buenos Aires	1983
Bab2 4	2	contenido estomacal	Chivilcoy, Buenos Aires	1979
Bab2 5	2	feto bovino	Los Toldos, Buenos Aires	1983
Bab2 6	2	leche	Luján, Buenos Aires	1992
Bab2 7	2	leche	Los Toldos, Buenos Aires	1983

^a Aislamientos excluidos del análisis goeBURST; s.i.: sin información.

Tabla 2 Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR

Primers	Forward (5' a 3')	Reverse (5' a 3')
HOOF Print 1	GGTGATTGCCGCGTGGTTCGGTTGAATGAG	Rev3 ^a
HOOF Print 3	CAGGCGCTTGAGGATGAGCGGCAG	Rev3
HOOF Print 4	GCAGAATTTTCGAGGCATTCGGCGATG	Rev3
HOOF Print 5	GTGCTCCAGGGCGCCGGGAGGTATGTTTAG	Rev3
HOOF Print 6	GCCGCAGAAAGCAGGCGATCTGGAGATTATC	Rev3
HOOF Print 2	CCCGCATGATCCGCGAACAGCTGGATG	Rev1 ^b
HOOF Print 7	CAGAGCCGTCGGTGGTTACTTGAGTAGGGCAG	Rev1
HOOF Print 8	GTGGGAAGCGTTATCCTTTAACGGGAGTAAGGG	Rev1
Rev1		GGGGAGTATGTTTTGGTTGCGCATGACCGC
Rev3		GGGGGCARTARGGCAGTATGTTAAGGGAATAGGG
VNTR 14	GATTGGGTTTCGAAACCATG	AACCTGTCGTCATGAAGTG
VNTR 21	GCAAGTAAACCGATCACAGAC	CGAAAAGGGAGCAGACATTA
VNR 7	CATCGATTATACCAATCGCG	AACACAGAGGCGATCAGGAT
VNTR 24	TGGCGATGGACGGCGGCTT	ACCCTGCTCATCCACTGC
VNTR 26	CGAAAGCGTTGCTGTGCAG	ACCGTCTATCAGCCTGCCA
VNTR 27	CGAATAACAGCGCCGCTCTT	ATGATCGCCGGGAATCGG

^a Combinación de oligonucleótidos *forward* con oligonucleótido Rev3.

^b Combinación de oligonucleótidos *forward* con oligonucleótido Rev1.

Resultados

Se tipificaron las cepas por los métodos convencionales. Las cepas de la biovariedad 1 no requieren suero, no crecen en medio con tionina pero sí con fucsina, presentan actividad ureasa y producción de H₂S. Las de la biovariedad 2 requieren suero, no crecen en medio con colorantes y también presentan actividad ureasa y producción de H₂S. De acuerdo

a las características bioquímicas evaluadas, 54 de las 61 cepas de *B. abortus* analizadas pertenecen a la biovariedad 1 y 7 a la biovariedad 2. Entre las cepas de la biovariedad 1 se encuentran la cepa de referencia 2308 y las cepas vacunales S19 y RB51.

En la tabla 3 se muestran los perfiles genotípicos de los aislamientos de *B. abortus* para 7 marcadores HOOF-Prints y 6 marcadores VNTR. El poder resolutivo del esquema MLVA

Tabla 3 Perfiles genotípicos de los aislamientos

Cepa	Perfil ^a	HOOF-Prints							VNTR					
		1	2	3	4	5	6	8	7	14	21	24	26	27
S19	A1	12	1	6	8	8	4	10	1	1	2	5	3	1
RB51	A1	12	1	6	8	8	4	10	1	1	2	5	3	1
2308	F1	11	1	6	8	6	5	10	1	1	2	5	3	1
Bab1 1	G0	11	1	6	8	6	4	10	0	1	2	5	3	1
Bab1 3	I1	10	4	5	5	4	3	10	1	1	2	5	3	1
Bab1 4	J0	10	2	6	9	6	4	13	0	1	2	5	3	1
Bab1 5	K0	11	2	6	9	6	4	10	0	1	2	5	3	1
Bab1 6	L0	11	2	6	4	4	4	10	0	1	2	5	3	1
Bab1 7	M1	10	4	5	8	6	4	10	1	1	2	5	3	1
Bab1 8	NO	11	2	6	5	4	3	13	0	1	2	5	3	1
Bab1 9	O1	11	4	5	8	3	3	14	1	1	2	5	3	1
Bab1 10	P1	9	4	6	5	5	3	7	1	1	2	5	3	1
Bab1 11	Q0	4	2	6	5	3	4	8	0	1	2	5	3	1
Bab1 12	R1	11	7	9	8	3	4	7	1	1	2	5	3	1
Bab1 13	S1	3	4	4	6	3	3	13	1	1	2	5	3	1
Bab1 14	T1	11	4	4	4	5	3	5	1	1	2	5	3	1
Bab1 15	U0	8	2	6	5	5	4	9	0	1	2	5	3	1
Bab1 16	V1	3	2	6	8	6	4	9	1	1	2	5	3	1
Bab1 17	W1	10	2	6	8	5	4	8	1	1	2	5	3	1
Bab1 20	D1	10	4	5	5	3	3	13	1	1	2	5	3	1
Bab1 21	D0	10	4	5	5	3	3	13	0	1	2	5	3	1
Bab1 22	B0	11	3	6	8	5	5	9	0	1	2	5	3	1
Bab1 23	B1	11	3	6	8	5	5	9	1	1	2	5	3	1
Bab1 24	Z0	2	3	6	6	3	5	8	0	1	2	5	3	1
Bab1 25	a1	11	3	6	5	5	5	9	1	1	2	5	3	1
Bab1 26	b1	10	4	5	4	3	3	13	1	1	2	5	3	1
Bab1 27	c0	8	4	4	3	3	3	9	0	1	2	5	3	1
Bab1 28	B1	11	3	6	8	5	5	9	1	1	2	5	3	1
Bab1 29	d1	8	4	12	3	3	3	9	1	1	2	5	3	1
Bab1 30	e0	6	7	4	4	3	3	7	0	1	2	5	3	1
Bab1 31	f0	11	3	6	8	7	5	11	0	1	2	5	3	1
Bab1 32	g0	11	3	5	8	6	5	11	0	1	2	5	3	1
Bab1 34	i1	11	3	6	8	6	3	9	1	1	2	5	3	1
Bab1 35	j1	11	2	5	8	6	3	2	1	1	2	5	3	1
Bab1 36	k0	11	4	6	8	7	3	9	0	1	2	5	3	1

Tabla 3 Perfiles genotípicos de los aislamientos (Continuación)

Cepa	Perfil ^a	HOOF-Prints							VNTR					
		1	2	3	4	5	6	8	7	14	21	24	26	27
Bab1 37	l1	10	2	5	5	3	3	13	1	1	2	5	3	1
Bab1 38	m0	11	5	6	8	7	3	9	0	1	2	5	3	1
Bab1 40	o1	10	2	5	5	3	3	12	1	1	2	5	3	1
Bab1 41	p0	11	2	5	8	7	5	10	0	1	2	5	3	1
Bab1 42	q0	11	4	6	8	7	5	10	0	1	2	5	3	1
Bab1 43	r1	2	4	6	5	3	3	9	1	1	2	5	3	1
Bab1 44	s1	10	2	4	5	3	3	13	1	1	2	5	3	1
Bab1 45	q0	11	4	6	8	7	5	10	0	1	2	5	3	1
Bab1 46	u1	10	4	5	5	3	3	14	1	1	2	5	3	1
Bab1 47	v1	10	2	5	5	3	3	14	1	1	2	5	3	1
Bab1 48	C0	11	2	6	8	8	5	10	0	1	2	5	3	1
Bab1 49	C0	11	2	6	8	8	5	10	0	1	2	5	3	1
Bab1 50	w0	11	2	6	8	8	5	9	0	1	2	5	3	1
Bab1 51	x0	11	2	6	7	8	5	10	0	1	2	5	3	1
Bab2 1	E1	11	2	6	8	6	5	10	1	1	2	5	3	1
Bab2 2	E1	11	2	6	8	6	5	10	1	1	2	5	3	1
Bab2 3	E1	11	2	6	8	6	5	10	1	1	2	5	3	1
Bab2 4	E1	11	2	6	8	6	5	10	1	1	2	5	3	1
Bab2 5	E1	11	2	6	8	6	5	10	1	1	2	5	3	1
Bab2 6	E1	11	2	6	8	6	5	10	1	1	2	5	3	1
Bab2 7	E1	11	2	6	8	6	5	10	1	1	2	5	3	1

^a El código de cada perfil correspondiente a la combinación de HOOF-Print y VNTR está formado por una letra y un número. Cada perfil diferente obtenido para los HOOF-Prints se identificó con una letra del alfabeto (la misma letra en mayúscula o minúscula indica perfiles diferentes). Los dos perfiles obtenidos para los VNTR se designaron 0 y 1.

utilizado es muy alto, de los 56 perfiles genotípicos determinados, 47 son únicos. No se obtuvo producto de amplificación del HOOF-Print 7; Bricker *et al.*³ mencionan que esta amplificación se puede optimizar mediante PCR multiplex con los HOOF-Prints 2 y 8, pero en nuestro caso tampoco se logró de esa manera. Los perfiles HOOF-Prints obtenidos para las cepas S19 y RB51 difieren de aquellos publicados previamente²⁴. Como era de esperar, ya que todos los aislamientos son de la misma especie, los *loci* VNTR analizados son monomórficos, excepto uno, el VNTR 7, que presenta dos alelos.

El número de alelos observado en cada *locus* en la población analizada está entre 1, en el caso de los VNTR, y 10, en el caso del HOOF-Print 8. Las frecuencias de los alelos HOOF-Prints se puede observar en la figura 1. Se calculó el índice de discriminación (ID) de cada *locus* según el índice de Hunter-Gaston (tabla 4), como sugiere el ESGEM.

De los aislamientos presentados en la tabla 1, tres poseen múltiples alelos para un *locus* dado (Bab1 2, 18 y 19) y de dos de ellos (Bab1 33 y 39) no se logró amplificar el alelo del HOOF-Print 8, por lo tanto, los cinco se excluyeron del estudio. La relación entre variantes genéticas descritas a partir de los 56 aislamientos restantes se determinó mediante el algoritmo goeBURST. Este algoritmo construye

complejos clonales compuestos por aquellos genotipos relacionados entre sí y que solo varían en 1 a 3 marcadores del *set* de 13 estudiados. Los genotipos descritos en el presente estudio se relacionaron en un gran complejo clonal, dentro del cual se pueden observar tres grandes agrupamientos conectados por el genotipo E1, correspondiente a los aislamientos de la biovariedad 2 (fig. 2A). Así, E1 correspondería al genotipo fundador del gran complejo clonal definido según variantes triples de alelos.

Por otro lado, el genotipo A1 (cepas vacunales) se encontró altamente relacionado con el F1, el cual corresponde a la cepa a partir de la cual se obtuvieron las cepas vacunales (*B. abortus* 2308). El algoritmo goeBURST permite realizar un análisis de los complejos clonales según datos asociados a la colección de muestras genotipificadas. De esta manera, los complejos clonales se evaluaron en el contexto espacial y temporal de la colección en estudio. Teniendo en cuenta el lugar de procedencia de las cepas, el análisis no mostró correlación entre la procedencia geográfica y los genotipos (figs. 2B y C), mientras que resultó interesante observar que el genotipo fundador E1 no solo fue el más frecuente, sino que además pudo ser aislado en diversos puntos en el tiempo (resultado no mostrado).

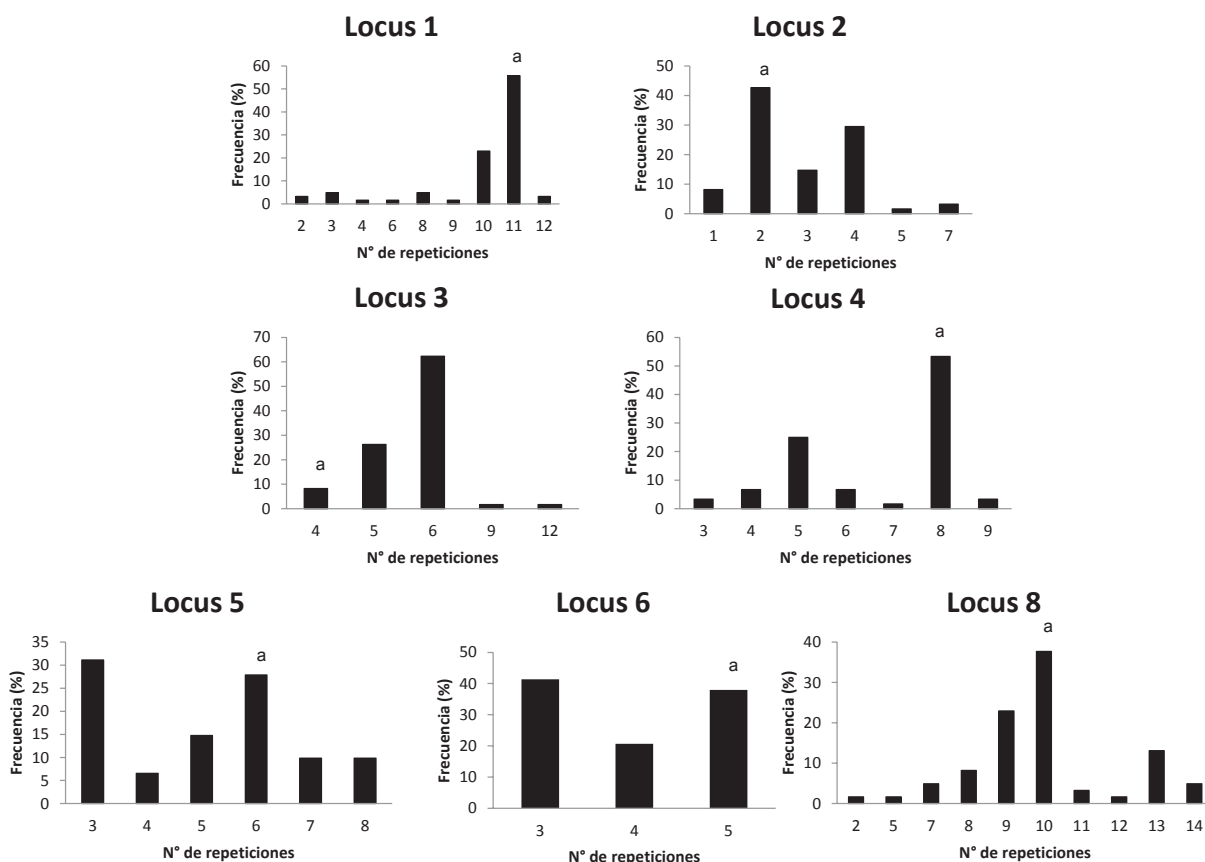


Figura 1 Frecuencia observada de los alelos HOOF-Prints en los aislamientos analizados en este trabajo. Los alelos correspondientes a las cepas de la biovariedad 2 se indican con la letra a.

Tabla 4 Poder discriminatorio de los 13 *loci* analizados en este trabajo

Locus	IDHG ^a	IC ^b	N.º alelos	Alelos ^c	Rango de tamaño (pb)
HOOF-Print 8	0,836	0,783-0,889	10	2, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14	91-187
HOOF-Print 5	0,786	0,720-0,853	6	3, 4, 5, 6, 7, 8	146-186
HOOF-Print 2	0,727	0,656-0,797	6	1, 2, 3, 4, 5, 7	93-141
HOOF-Print 4	0,700	0,609-0,792	7	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9	147-195
HOOF-Print 1	0,687	0,578-0,796	9	2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12	140-220
HOOF-Print 6	0,648	0,585-0,711	3	3, 4, 5	166-182
HOOF-Print 3	0,601	0,493-0,709	5	4, 5, 6, 9, 12	151-215
VNTR 7	0,507	0,482-0,532	2	0, 1	260-279
VNTR 24	0,000	0,000-0,142	1	5	275
VNTR 14	0,000	0,000-0,142	1	1	113
VNTR 26	0,000	0,000-0,142	1	3	214
VNTR 21	0,000	0,000-0,142	1	2	171
VNTR 27	0,000	0,000-0,142	1	1	212

^a Índice de discriminación de Hunter-Gaston. Los marcadores se encuentran ordenados de mayor a menor poder discriminatorio.

^b Intervalo de confianza para el IDHG, con un nivel de confianza del 95 %.

^c Los alelos se nombran según el número de repeticiones.

Discusión

El esquema de MLVA utilizado en este trabajo se eligió sobre la base de los esquemas publicados al momento de diseñar este estudio y la habilidad de ellos para tipificar los aislamientos, así como de la disponibilidad de recursos y tecnología y de la experiencia requerida para realizar la técnica.

Como los marcadores HOOF-Prints son muy discriminitorios, la gran mayoría de los perfiles obtenidos resultaron ser únicos. La discrepancia observada entre los perfiles HOOF-Prints publicados y la obtenida en ese trabajo para las cepas vacunales S19 y RB51 se debe a la alta tasa de mutación de los *loci* analizados. De hecho, el polimorfismo observado en las regiones no codificantes del genoma donde se encuentran unidades repetidas en tándem se debe a la alta tasa de mutación de estos *loci*. Pero, por otro lado, esto también dificulta la asignación de un aislamiento a una de las especies reconocidas. Los HOOF-Prints son muy eficientes para distinguir cepas en un brote local, pero son incapaces de predecir correctamente la biovariedad o la especie a la que corresponde un aislamiento dado¹¹. Es por eso que el análisis de los resultados debe realizarse con cautela y utilizar la genotipificación por los HOOF-Prints como complemento de los estudios epidemiológicos tradicionales, no como único método de tipificación.

Cuando se compara el poder discriminatorio de los HOOF-Prints obtenidos en este trabajo con los disponibles en la literatura, no hay diferencias importantes, excepto en el HOOF-Print 8. En el presente trabajo se obtuvo un IDHG de 0,83, mientras que en el estudio de Bricker *et al.*⁴ dicho valor fue 0. Esta discrepancia puede deberse a los criterios utilizados para la selección de los aislamientos en estudio. Dado que la diversidad global de los VNTR utilizados por Whatmore *et al.* es similar a la de los HOOF-Prints para una misma población, poseen el mismo poder de discriminación²⁴.

Las dificultades técnicas ocasionadas al tener 7 *loci* adicionales de difícil detección para nuestras condiciones de trabajo no traerían aparejado un aumento significativo en el poder de discriminación del método, por este motivo se decidió que el grupo de marcadores hipervariables estaría compuesto únicamente por los *loci* HOOF-Prints, y el grupo de marcadores más estables lo formarían los *loci* VNTR seleccionados. Los *loci* VNTR empleados en este trabajo presentaron escasa o nula variabilidad ya que fueron seleccionados con el objeto de diferenciar las distintas especies. Se los incluyó en este estudio para comparar el perfil genotípico de este conjunto de aislamientos locales con aquellos publicados por otros autores para cepas de *B. abortus* de otras regiones del mundo, y sorprendentemente, se encontraron diferencias. En el trabajo de Whatmore *et al.*²⁴, el alelo de las cepas de *B. abortus* para el locus VNTR 7 es el 2 y para el locus VNTR 26 es el 4, mientras que en el presente trabajo los alelos obtenidos fueron 0 y 1 para el locus VNTR 7, y 1 para el locus VNTR 26. Si bien estos marcadores son muy estables, no están exentos de sufrir mutaciones; de hecho, los autores mencionados anteriormente encontraron una delección de 3 pb en una de las copias de la repetición en un alelo del VNTR 7²⁴.

Existen en la literatura ejemplos del uso combinado de un grupo de marcadores HOOF-Prints y VNTR. El esquema

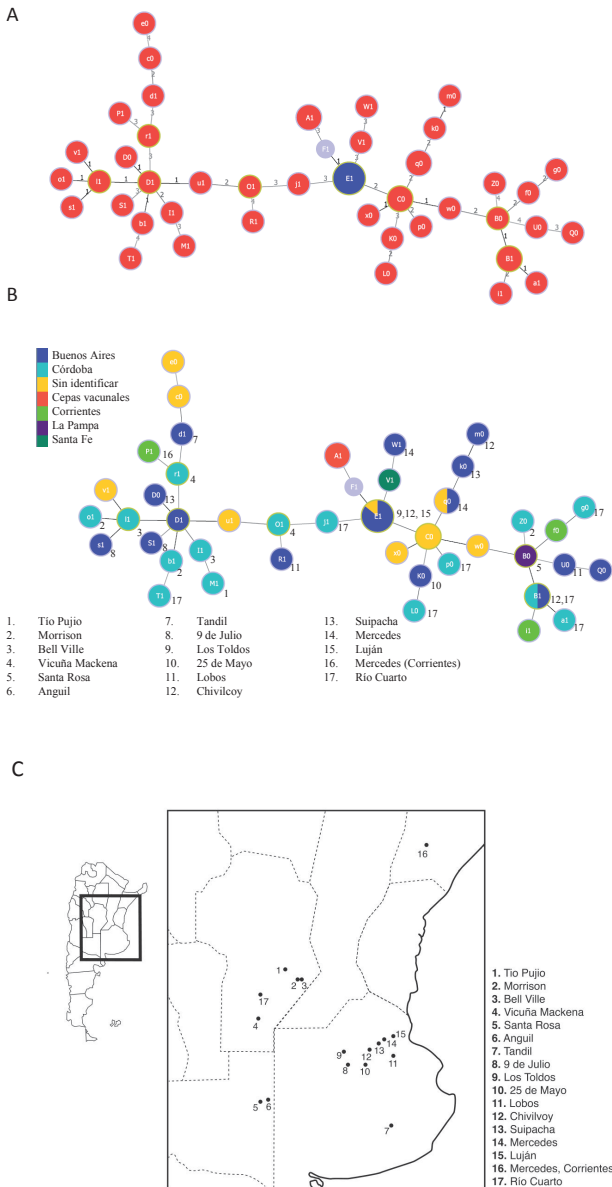


Figura 2 Relación entre los aislamientos y la cepa de referencia mediante goeBURST a partir de los 13 marcadores estudiados. F1 corresponde al genotipo de la cepa de referencia *B. abortus* 2308. A. Se observan un complejo clonal con el genotipo fundador E1. El genotipo F1 corresponde a la cepa 2308 de la cual derivan las cepas vacunales S19 y RB51 (genotipo A1). Cada círculo representa un único perfil, su tamaño refleja la frecuencia de ese genotipo. Los círculos rojos corresponden a aislamientos de la biovariedad 1 y los azules a la biovariedad 2. El número sobre las ramas indica en cuántos *loci* difieren los dos aislamientos conectados. B. Relación geográfica entre los perfiles genotípicos de los aislamientos. Los colores de los círculos representan a las diferentes provincias y los números indican la localidad de dónde proviene la cepa. C. Mapa de la Argentina donde están indicados, en la región ampliada, los lugares de procedencia de los aislamientos analizados. La mayoría de los aislamientos provienen del sur de Córdoba y del noreste de Buenos Aires.

de 10 *loci* VNTR utilizado por Beja-Pereira *et al.*² y Higgins *et al.*⁸ está compuesto por una combinación de 4 marcadores HOOF-Prints y 6 VNTR, que surgió de un estudio llevado a cabo por B. Harris en 2008⁸. A partir de la genotipificación de 82 aislamientos de *Brucella* utilizando el esquema completo de 21 marcadores, este autor eligió aquellos 10 que permiten diferenciar los aislamientos en *clusters* relevantes desde el punto de vista epidemiológico.

Según los resultados obtenidos en este trabajo, el genotipo E1 se encuentra únicamente en la provincia de Buenos Aires. Pero considerando que la mayoría de los aislamientos provienen de dicha provincia, esta distribución podría deberse a un sesgo de la muestra.

Por otro lado, es posible que la rápida evolución de los *loci* Hoof-Prints enmascare las diferencias regionales en la composición de los genotipos, es decir, se podrían obtener dos genotipos iguales en aislamientos no relacionados. La destacable permanencia temporal del genotipo E1 indicaría que estos aislamientos tendrían una alta eficacia biológica (*fitness*). Aún cuando el genotipo E1 fuera el más frecuente, solo por un hecho matemático, esto aumentaría la probabilidad de que sufra mutaciones y que, de esta manera, se generen nuevas cepas y/o especies.

Este trabajo aporta evidencias a favor de la teoría de Margaret Meyer¹⁷, quien, basándose en evidencias bioquímicas, en la década de los 80 postuló que sería la biovariedad 2 de *B. abortus* el organismo que dio origen a todo el género.

Como herramienta epidemiológica, el MLVA ofrece una destacable resolución comparado con los métodos de tipificación convencionales, que generalmente no tienen poder discriminativo por debajo del nivel de biovariedad. Los marcadores que se incluyen en un estudio de MLVA de forma separada no son informativos, son muy variables o muestran un alto nivel de homoplasia, pero la combinación de un grupo bien seleccionado de estos marcadores podría ser muy discriminativa. Actualmente se está empleando el esquema de MLVA propuesto por Le Flèche *et al.*¹¹; los agrupamientos de las cepas de *B. abortus* en biovariedades 1, 2 y 4 generados por este esquema concuerdan con los resultados de la tipificación bioquímica y el patrón de PCR-RFLP para el gen *omp2a*. El MLVA es una técnica relativamente sencilla, ya que solo requiere determinar el tamaño del producto de amplificación de la PCR (que se puede hacer de manera automática, mediante electroforesis capilar en un secuenciador de ADN, o con los métodos de electroforesis tradicionales en geles de agarosa o poliacrilamida), y además permite el fácil intercambio de información entre grupos, por ejemplo, mediante la construcción de bases de datos *on line* con los perfiles genotípicos de todos los aislamientos, como MLVA Bank¹⁶.

En suma, el empleo de este esquema de MLVA en aislamientos de *Brucella abortus* de Argentina permitió establecer la biovariedad a la que estos corresponden. Asimismo, a través del análisis goeBURST se pudo relacionar a todos los genotipos entre sí y proponer al genotipo de la biovariedad 2 como fundador.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por los proyectos de INTA «Brucelosis» (AESA 2581) y «Conservación y valoración de recursos genéticos microbiológicos» (AERG-231251). Los autores agradecen a la Dra. Paula Ruybal por su invaluable colaboración en el análisis goeBURST y por la lectura y corrección del manuscrito. Durante el desarrollo de este trabajo, DH era becario de CONICET, Argentina.

Bibliografía

1. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Bacteriological and serological methods. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris, France: INRA; 1988, p. 13-136.
2. Beja-Pereira A, Bicker B, Chen S, Almendra C, White PJ, Luikart G. DNA Genotyping suggest that recent brucellosis outbreaks in the Greater Yellowstone Area Originated from elk. *J Wildl Dis.* 2009;45:1174-7.
3. Bricker BJ, Ewalt DR, Halling SM. *Brucella* "HOOF-Prints": strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). *BMC Microbiol.* 2003;11:3-15.
4. Bricker BJ, Ewalt DR. Evaluation of the HOOF-Print assay for typing *Brucella abortus* strains isolated from cattle in the United States: results with four performance criteria. *BMC Microbiol.* 2005;5:37-47.
5. Francisco AP, Vaz C, Monteiro PT, Melo-Cristino J, Ramirez M, Carriço JA. PHYLOViZ: Phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing method. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:87-97.
6. García-Yoldi D, Le Fleche P, De Miguel MJ, Muñoz PM, Blasco JM, Cvetnic Z, Marin CM, Vergnaud G, López-Goñi I. Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with other PCR-based methods for typing *Brucella suis* isolates. *J Clin Mic.* 2007;45:4070-2.
7. Gee JE, De BK, Levett PN, Whitney AM, Novak RT, Popovic T. Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid confirmatory identification of *Brucella* isolates. *J Clin Microbiol.* 2004;42:3649-54.
8. Higgins J, Stuber T, Quance C, Edwards WH, Tiller RV, Linfield T, Rhyan J, Harris B. Molecular epidemiology of *Brucella abortus* isolates from cattle, elk and bison in the United States, 1998 to 2011. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78:3674-84.
9. Kattar MM, Jaafar RF, Araj GF, Le Flèche P, Matar MG, Rached RA, Khalife S, Vergnaud G. Evaluation of a multilocus variable-number tandem-repeat analysis scheme for typing human *Brucella* isolates in a region of brucellosis endemicity. *J Clin Microbiol.* 2008;45:3935-40.
10. Le Flèche P, Hauck Y, Oteniente L, Prieur A, Denoeud F, Ramiisse V, Sylvestre P, Benson G, Ramiisse F, Vergnaud G. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol.* 2001;1:2.
11. Le Flèche P, Jacques I, Grayon M, Al Dahouk S, Bouchon P, Denoeud F, Nöckler K, Neubauer H, Guilloteau LA, Vergnaud G. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.* 2006;6:9.
12. Levinson G, Gutman GA. Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol.* 1987;4:203-21.
13. Lucero NE, Ayala SM, Escobar GI, Jacob NR. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiol Infect.* 2008;136:496-503.

14. Lucero NE, Tenenbaum M, Jacob NR, Escobar GI, Groussaud P, Whatmore AM. Application of variable number tandem repeats typing to describe familial outbreaks of brucellosis in Argentina. *J Med Microbiol.* 2010;59:648-52.
15. Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, Tibayrenc M, Locht C, Supply P. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:1901-6.
16. MLVA Bank. Disponible en: <http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/index.php>
17. Meyer M. Evolutionary development and taxonomy of the genus *Brucella*. En: Adams LG, editor. *Advances in brucellosis research*. Austin, Texas: A&M University Press, College Station; 1990. p. 12-35.
18. Paques F, Leung WY, Haber JE. Expansion and contractions in a tandem repeat induced by double-strand break repair. *Mol Cell Biol.* 1998;18:2045-54.
19. Samartino, LE. Brucellosis in Argentina. *Vet Microbiol.* 2002;90:71-80.
20. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Plan Nacional de Control y Erradicación de la Brucelosis y Tuberculosis bovina. Resolución 115/99. Mimeo. 1999;62.
21. Struelens MJ: Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing system. *Clin Microbiol Infect.* 1996;2:2-11.
22. Valdezate S, Navarro A, Rubio V, Garin-Bastuji B, Albert D, Hernandez P, Alonso PM, Saéz-Nieto JA. Emergence of a clonal lineage of *Brucella abortus* biovar 3 in clinical cases in Spain. *J Clin Microbiol.* 2009;47:2687-8.
23. Verger JM, Grimont F, Grimont PAD, Grayon M. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int J Syst Bacteriol.* 1985;35:292-5.
24. Whatmore AM, Shankster SJ, Perrett LL, Murphy TJ, Brew SD, Thirlwall RE, Cutler SJ, MacMillan AP. Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for typing of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1982-93.