

Estudio comparativo de la susceptibilidad al estrés ácido, oxidativo y sobrevivida en macrófagos en aislamientos de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Colombatti Olivieri MA¹, Berná L², Cuerda MX¹, Alvarado Pinedo F³, Romano MI¹, Santangelo MP¹

¹Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABiMo), UEDD INTA-CONICET, Castelar, Argentina. ²Unidad de Biología Molecular, Instituto Pasteur, Montevideo, Uruguay. ³Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias, FCV, UNLP, Chascomús, Argentina

INTRODUCCIÓN

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (Map) es el agente causal de la paratuberculosis. Poco se conoce sobre los factores de virulencia en este patógeno. En un trabajo previo seleccionamos tres cepas, aisladas a partir de bovinos en Argentina, con diferente grado de virulencia en un modelo murino¹. Posteriormente se realizó la secuenciación de los genomas completos (UGB, IABiMo, INTA) utilizando el equipo MiSeq de Illumina y el análisis de las secuencias se realizó en la unidad de Bioinformática del Institut Pasteur de Montevideo. Se buscaron cambios a nivel nucleotídico en comparación con la cepa de referencia K10. Realizamos un estudio de genómica comparativa y detectamos una delección de 12pb en gen *Map_0403* en la cepa de alta virulencia Map 1347. La misma se confirmó por PCR utilizando primers flanqueando la delección y que amplifican una banda de 160pb en la cepa 1347, mientras que en la secuencia WT (cepa K-10, 6611 y 1543) amplifica una banda de 172pb. La delección produce la falta de 4 aminoácidos en la posición 357 de la proteína (357-VVFG-360), que codifica para una posible proteasa con un dominio trypsin-peptidasa que no parece estar afectado por la mutación. La proteína *Map_0403* es homóloga a *Rv3671c* que está bien caracterizada en *Mycobacterium tuberculosis* fue asociada a protección del estrés ácido y oxidativo que encuentra dentro de los fagosomas en los macrófagos².

OBJETIVO

Demostrar el rol de *Map_0403* en Map, y si la mutación encontrada afecta de alguna manera la virulencia mediante ensayos de infección de macrófagos derivados de monocitos bovinos (MDMB) y de resistencia a pH ácido y H₂O₂.

MATERIALES & MÉTODOS

Se utilizaron cepas con diferente grado de virulencia, previamente evaluadas en el modelo murino: 1347 (alta virulencia), 6611 (alta-mediana virulencia), 1547 (baja virulencia) y la cepa de referencia K-10 (baja virulencia). Los cultivos Map se centrifugaron, lavaron y re-suspendieron en PBS. Los grumos se eliminaron mediante 20 pasajes a través de una jeringa con una aguja de 25G. Los inóculos se estimaron por densidad óptica (DO). Se realizaron 2 ensayos de infección de MDMB provenientes de diferentes animales utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 10:1, y se evaluó la sobrevivida de Map a los 2, 4 y 6 días post-infección. Por otro lado, se cultivaron a pH 7 y pH 4.5 (con buffer fosfato-citrato HCl 2N) en 7H9 suplementado (10% ADC, 0.5% glicerol, 0.02% tyloxipol y 2mg/L micobactina) por 6, 12, 30 y 75 días; y se evaluó la sensibilidad a diferentes concentraciones de H₂O₂ (0, 5, 20 y 50mM) por 3hs de exposición en 7H9 suplementado. Para ambos ensayos de resistencia a pH y H₂O₂ se uso un inóculo de 1x10⁶ UFC/mL y se tomaron alícuotas a los tiempos indicados para el recuento de UFC (Unidades Formadoras de Colonia).

RESULTADOS

Se observó que las cepas 1347 y 6611 fueron las que tuvieron mayor sobrevivida en MDMB (Figura 1) y fueron las que tuvieron mayor resistencia al H₂O₂ (Figura 2). Con respecto al pH ácido, la cepa 6611 fue la que mostro mayor sensibilidad, observándose solo diferencias significativas a los 6 días de cultivo (Figura 3).

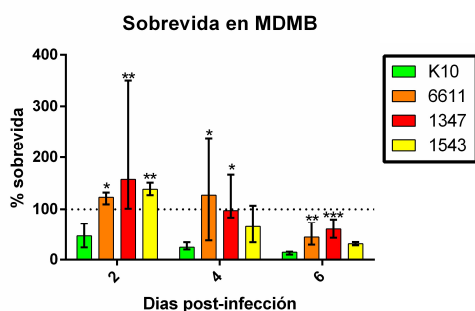


Figura 1: Sobrevivida en macrófagos derivados de monocitos bovinos (MDMB). Se realizaron 2 ensayos independientes utilizando una MOI 10:1. Los datos se muestran como la mediana (%) ± rango intercuartílico. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn, comparando los grupos infectados con la cepa de referencia K-10 (* p < 0,05, ** p < 0,01)

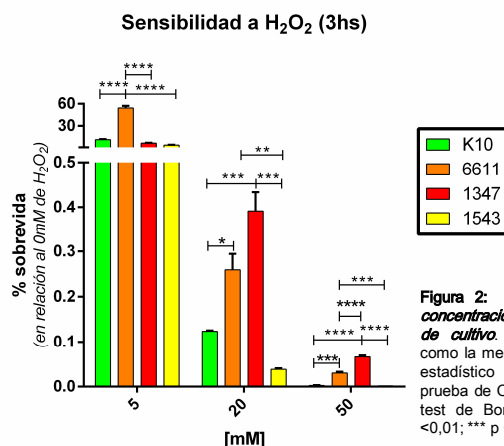


Figura 2: Sensibilidad a diferentes concentraciones de H₂O₂ durante 3hs de cultivo. Los datos se muestran como la media (%) ± SEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de One-way ANOVA y el post-test de Bonferroni (* p < 0,05, ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001)

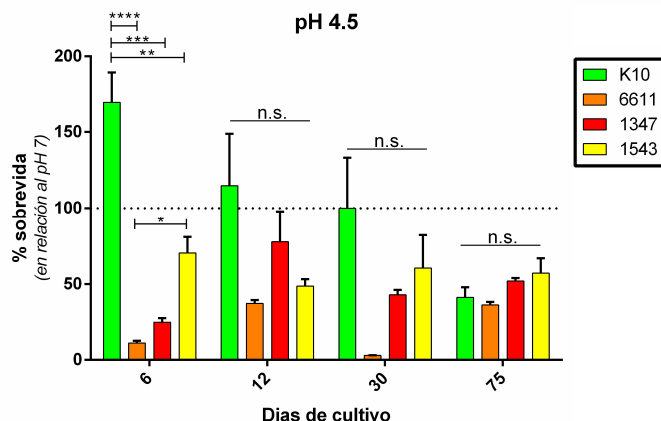


Figura 3: Sensibilidad a pH ácido durante 6, 12, 30 y 75 días de cultivo. Los datos se muestran como la media (%) ± SEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de One-way ANOVA y el post-test de Bonferroni (* p < 0,05, ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001)

CONCLUSIONES

La delección de 12pb en el gen *Map_0403* en la cepa 1347 no disminuyó la susceptibilidad al estrés ácido y oxidativo, ni a la sobrevivida en MDMB. Si bien se requieren más estudios para evaluar el rol de este gen en la virulencia de Map, habría que determinar si un cambio en la estructura de *Map_0403* debido a la delección podría contribuir al aumento en la protección frente al estrés ácido y oxidativo.

1- Colombatti Olivieri et al. (2018). Protection efficacy of Argentinian isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with different genotypes and virulence in a murine model. *Research in Veterinary Science*. Volume 121, December 2018, Pages 4-11.

2 Biswas et al. (2010) Structural insight into serine protease Rv3671c that Protects *M. tuberculosis* from oxidative and acidic stress. *Structure*. 2010 Oct 13;18(10):1353-63. doi: 10.1016/j.str.2010.06.017. PMID: 20947023; PMCID: PMC2955984.