UNIVERSIDAD DE OVIEDO

PROGRAMA DE DOCTORADO: Avances en Medicina

Epidemiología molecular de la Tuberculosis en Asturias

Ana Penedo Pallares

Tesis Doctoral

2012

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

PROGRAMA DE DOCTORADO: Avances en Medicina

Epidemiología molecular de la Tuberculosis en Asturias

Ana Penedo Pallares

Tesis Doctoral

2012

RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Epidemiología molecular de la Tuberculosis en Asturias 2004- 2010	Inglés: Molecular Epidemiology of Tuberculosis in Asturias 2004 - 2010

2.- Autor	
Nombre: Ana Penedo Pallares	
Programa de Doctorado: Avances en Medicina	
Órgano responsable: **Departamento de Medicina**	

RESUMEN (en español)

La tuberculosis sigue siendo en la actualidad una de las enfermedades infecciosas con mayor tasa de mortalidad en el mundo. En Esp incidencia de la tuberculosis se sitúa en torno a los 15-20 casos por 100.000 habitantes; esta tasa duplica o triplica a la de otros países de r entorno. Asturias se encuentra situada dentro la media española. La epidemiología molecular de la tuberculosis pretende detectar y confirmar identificar cepas de importancia en salud pública; conocer la extensión global de los patógenos; mejorar el conocimiento de las dinámi transmisión y vías de diseminación de la enfermedad; y con ello desarrollar nuevas estrategias para luchar contra la tuberculosis. Las té moleculares: RFLP-IS6110, MIRU-VNTR y *Spoligotyping*, son en la actualidad las herramientas más empleadas en los estudios de epidem molecular de la tuberculosis. Con el presente estudio nos propusimos valorar la aportación de dos técnicas moleculares de genotipificación (IS6110 y *Spoligotyping*) dentro de una estrategia de epidemiología molecular de la tuberculosis en Asturias incorporando una herra diagnóstica objetiva con la que poder ahondar en las dinámicas de transmisión de la tuberculosis en nuestro medio. Ha sido posible genotip del 98% de las 1255 cepas de *M. tuberculosis* complex aisladas en Asturias durante el período junio 2004-diciembre 2010 mediante dos té moleculares de referencia: RFLP-IS6110 y *Spoligotyping*. Es reseñable la gran variedad de genotipos circulantes encontrados en nuestro medi por RFLP-IS6110 y 281 por *Spoligotyping*. La tasa de agrupamiento de las cepas de *M. tuberculosis* complex aisladas en Asturias fue del 39,3 RFLP-IS610 y del 86,3% por *Spoligotyping*. Las mayores tasas de agrupamiento se han detectado en las áreas sanitarias más pobladas y en las urbanas. Este estudio nos ha permitido conocer el número, la extensión, y la distribución de los *clusters* presentes en Asturias. Se han ident las cepas más prevalentes en nuestra Comunidad, asimismo se ha podido constatar la expansión de cepas emergentes. El porcentaje de pa "huérfanos" fue del 54,6% por RFLP-IS610 y del 13,5% por *Spoligotyping*. Se pudo diferenciar entre reactivación y reinfección en ac pacientes en los que se disponía de las cepas implicadas en los diferentes episodios de tuberculosis. Los resultados obtenidos mediante RFLP y *Spoligotyping* fueron coincidentes en un 19,5% y discrepantes en un 80,5%, sin embargo creemos que las discrepancias deberían ser interpr ponderando los grados de similitud o de diferencia en los patrones obtenidos. La especie *M. tuberculosis* representó el 98,2% de los aislamien taxón *M. tuberculosis* complex en Asturias, le seguían *M. bovis* 1,2%; *M. africanum* 0,3%; y *M. bovis* BCG 0,15%. Hemos confirmado la pre en Asturias de cepas importadas de *M. tuberculosis*, siendo posible monitorizar las dinámicas de expansión y/o extinción de las mism detectaron a tiempo algunos errores por contaminación cruzada intra-laboratorio. Finalmente, creemos que los resultados obtenidos en r estudio avalan utilización sistemática de las herramientas moleculares en el contexto de la epidemiología de la tuberculosis en Asturias.

RESUMEN (en Inglés)

Tuberculosis (TB) is one of the main infectious causes of death worldwide. The estimed incidence of TB in Spain is 15-20 cases per 100000 population; a declining trend was observed since ninety's, however, this rate is higher than that of other neighboring countries. The incidence rate of TB in Asturias is similar to the Spanish average. Molecular epidemiology of TB identifies and confirms outbreaks; identifies strains of public health importance; reveals the global spread of pathogens; make understanding possible of the dynamics of pathogens transmission; thus contributing to the design of new strategies to stop TB. Molecular techniques: RFLP-IS6110, *Spoligotyping* and MIRU-VNTR, are currently the most used tools in molecular epidemiology of TB. The aims of the present study were to determinate the genetic diversity of *M. tuberculosis* complex using two typing methods (RFLP-IS6110 and *Spoligotyping*) to improve understanding of the dynamics of TB transmission in Asturias. Genotyping was completed in 98% of the 1255 strains of *M. tuberculosis* complex isolated in Asturias from June 2004 to December 2010 using two reference molecular techniques: RFLP-IS6110 and *Spoligotyping*. Our results showed a high degree of genetic diversity, the number of types obtained by each method was 913 and 281 by RFLP-IS6110 and *Spoligotyping*, respectively. The clustering values in Asturias by RFLP-IS6110 and *Spoligotyping* were 39.3% and 86.3% respectively. The highest clustering rates were recorded in populated areas, mostly urban. This study has allowed us to know the number, extent, and distribution of the clusters present in Asturias, in addition to knowing the most prevalent strains in our region. The percentage of unique patterns was 54.6% and 13.5 for RFLP-IS6110 and Spoligotyping, respectively. We differentiate cases to exogenous reinfection from endogenous reactivation in those patients who had several episodes of tuberculosis. The results obtained by RFLP-IS6110 and Spoligotyping, were concordant in 19.5% and discrepant in 80.5%, but we believe that the discrepancies should be interpreted considering the degree of similarity or difference in the obtained patterns. *M. tuberculosis hominis* was the most frequently isolated species (98.2%), followed by *M. bovis* (1.2%), *M. africanum* (0.3%), and *M. bovis* BCG (0.1%). We also confirmed the presence of imported strains of *M. tuberculosis* in Asturias, the molecular tools enable us also to check if they expand or become extinct. Molecular typing has helped to highlight the chains of transmission, but genotyping data must be interpreted together with epidemiologic information. Several detected errors due to cross-contamination intra-laboratory were corrected in-time. We think that our study proved the usefulness of the simultaneous use of two molecular tools in a strategy of molecular epidemiology of TB in Asturias..

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE MEDICINA

FOR-MAT-VOA-010-BIS

Agradecimientos

Esto parecía fácil pero va resultar ser lo más difícil de todo. Tengo que dar las gracias a todas aquellas personas que han estado conmigo durante todo el tiempo que ha durado este proyecto y que fueron imprescindibles para su realización:

En primer lugar, al Doctor Juan José Palacios porque un 24 de Marzo (Día mundial de la Tuberculosis) pasé por su despacho a ver que era todo eso del MTB complex, RFLPs, epidemiología molecular... y tras ver su pasión y sus ganas, decidí empezar este proyecto.

Gracias por abrirme las puertas del laboratorio, por luchar contra mi escepticismo, por ser tan entusiasta, por no fiarte de mí en las correcciones (apostaría a que no hay ni una sola falta de ortografía), en general por toda la paciencia y por hacer de ésta tu segunda tesis.

Al Doctor José Luís Díez Jarilla, por todas las facilidades recibidas para llevar a cabo este trabajo. Sin su colaboración no hubiera sido posible.

Al Doctor Jose Ignacio Fernández Bernaldo de Quirós, por su disposición, su simpatía y su interés siempre en todo lo relacionado con la Tuberculosis, por aceptar formar parte de este trabajo a ojos cerrados.

A Amelia González López, Ana Fernández Verdugo, Mario Margolles Martins y Dolores Pérez Hernández del Servicio de Vigilancia Epidemiológica, Dirección General de Salud Pública; por su interés en la implantación de nuevas herramientas de genotipado en Asturias y por toda la información facilitada de los pacientes diagnósticados que forman parte de este trabajo.

A Jose María García, Fernando Álvarez Navascués, Begoña González González y Ana Fernández Quiroga; porque a través de su proyecto de investigación del Instituto Carlos III tuvimos acceso a los datos de los pacientes del área III. Gracias a su trabajo y su colaboración hemos podido realizar un estudio mucho más completo del área III.

A la Red de Laboratorios de Microbiología del SESPA, por todas las cepas recibidas, porque sin su colaboración no hubiera sido posible realizar este proyecto.

Al personal del Servicio de Microbiología y Enfermedades infecciosas del Gregorio Marañón, por su colaboración en uno de los estudios realizados y su aportación de los datos de MIRU.

A María Francisca Copano Romero del Laboratorio de Sanidad animal de Jove y a Lucía de Juan del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria de la Universidad Complutense por permitirnos el acceso a su base de datos.

A las *chicas* del laboratorio:

En primer lugar a Ángela, mi compañera de camarote, porque si ya tenías poco con el RFLP, ahora te dejé en herencia también el Spoligo. Porque sólo tu sabes lo que es asomar la cabeza a una cubeta después de cuatro días y ver una película negra. Por todas las conversaciones que hacían que la mañana pasara volando.

A Zulima, porque entre comprar billetes por Internet, leer blogs, repasar las capitales europeas, aprender recetas de cocina express, escuchar a Vaughan... todavía nos quedaba algo de mañana para pipetear.

A Totes, por los buenos momentos. Sigue apuntando el resultado de las carreras que este año promete.

A Ángeles e Isabel, porque me lo pasé muy bien en la hora del café y estuve muy entretenida escuchando el punto de vista de las madres.

A Isabel, Mª José, Camino, Macarena, Delfi y Eva porque da gusto trabajar con gente así, habéis puesto el listón muy alto a mis futuros compañeros de trabajo.

A todos los residentes y alumnos que habéis pasado por el laboratorio, a los técnicos que ya no están y a las auxiliares que venían alguna temporada.

Quiero dar las gracias a mis amigos por haberme aguantado todo este tiempo (Y lo que os queda):

A Adriana, por las horas desestresantes en el gym, porque mientras das puñetazos al aire no se piensa y por esas conversaciones en el vestuario.

A Marta, porque no es diseñadora gráfica pero está siempre al otro lado del whatsapp para poner calma en las pequeñas crisis.

A Víctor, por amenizarme los últimos meses delante del ordenador con temazos varios y chistes malos (Muy malos).

A Dani, por aparecer siempre con un paraguas rojo cuando se le necesita. (SC).

Al resto de amigos, por formar parte de ese resto y darme tan buenos momentos.

A mi familia, por estar ahí todos los días y por su apoyo incondicional.

Resumen

La tuberculosis sigue siendo en la actualidad una de las enfermedades infecciosas con mayor tasa de mortalidad en el mundo. En España la incidencia de la tuberculosis se sitúa en torno a los 15-20 casos por 100.000 habitantes; esta tasa duplica o triplica a la de otros países de nuestro entorno. Asturias se encuentra situada dentro la media española. La epidemiología molecular de la tuberculosis pretende detectar y confirmar brotes; identificar cepas de importancia en salud pública; conocer la extensión global de los patógenos; mejorar el conocimiento de las dinámicas de transmisión y vías de diseminación de la enfermedad; y con ello desarrollar nuevas estrategias para luchar contra la tuberculosis. Las técnicas moleculares: RFLP-IS6110, MIRU-VNTR y *Spoligotyping,* son en la actualidad las herramientas más empleadas en los estudios de epidemiología molecular de la tuberculosis. Con el presente estudio nos propusimos valorar la aportación de dos técnicas moleculares de genotipificación (RFLP-IS6110 y *Spoligotyping*) dentro de una estrategia de epidemiología molecular de la tuberculosis en Asturias incorporando una herramienta diagnóstica objetiva con la que poder ahondar en las dinámicas de transmisión de la tuberculosis en nuestro medio. Ha sido posible genotipar más del 98% de las 1255 cepas de *M. tuberculosis* complex aisladas en Asturias durante el período junio 2004-diciembre 2010 mediante dos técnicas moleculares de referencia: RFLP-IS6110 y *Spoligotyping.* Es reseñable la gran variedad de genotipos circulantes encontrados en nuestro medio: 913 por RFLP-IS6110 y 281 por *Spoligotyping*. La tasa de agrupamiento de las cepas de *M. tuberculosis* complex aisladas en Asturias fue del 39,3% por RFLP-IS6110 y del 86,3% por *Spoligotyping*. Las mayores tasas de agrupamiento se han detectado en las áreas sanitarias más pobladas y en las zonas urbanas. Este estudio nos ha permitido conocer el número, la extensión, y la distribución de los *clusters* presentes en Asturias. Se han identificado las cepas más prevalentes en nuestra Comunidad, asimismo se ha podido constatar la expansión de cepas emergentes. El porcentaje de patrones "huérfanos" fue del 54,6% por RFLP-IS6110 y del 13,5% por *Spoligotyping.* Se pudo diferenciar entre reactivación y reinfección en aquellos pacientes en los que se disponía de las cepas implicadas en los diferentes episodios de tuberculosis. Los resultados obtenidos mediante RFLP-IS6110 y *Spoligotyping* fueron coincidentes en un 19,5% y discrepantes en un 80,5%, sin embargo creemos que las discrepancias deberían ser interpretadas, ponderando los grados de similitud o de diferencia en los patrones obtenidos. La especie *M. tuberculosis* representó el 98,2% de los aislamientos del taxón *M. tuberculosis* complex en Asturias, le seguían *M. bovis* 1,2%; *M. africanum* 0,3%; y *M. bovis* BCG 0,1%. Hemos confirmado la presencia en Asturias de cepas importadas de *M. tuberculosis*, siendo posible monitorizar las dinámicas de expansión y/o extinción de las mismas. Se detectaron a tiempo algunos errores por contaminación cruzada intra-laboratorio. Finalmente, creemos que nuestro estudio muestra las ventajas del uso simultáneo de dos herramientas moleculares en el contexto de la epidemiología de la tuberculosis en Asturias.

Summary

Tuberculosis (TB) is one of the main infectious causes of death worldwide. The estimed incidence of TB in Spain is 15-20 cases per 100000 population; a declining trend was observed since ninety's, however, this rate is higher than that of other neighboring countries. The incidence rate of TB in Asturias is similar to the Spanish average. Molecular epidemiology of TB identifies and confirms outbreaks; identifies strains of public health importance; reveals the global spread of pathogens; make understanding possible of the dynamics of pathogens transmission; thus contributing to the design of new strategies to stop TB. Molecular techniques: RFLP-IS6110, *Spoligotyping* and MIRU-VNTR, are currently the most used tools in molecular epidemiology of TB. The aims of the present study were to know the genetic diversity of *M. tuberculosis* complex using two typing methods (RFLP-IS6110 and *Spoligotyping*) to improve understanding of the dynamics of TB transmission in Asturias. Genotyping was completed in 98% of the 1255 strains of *M. tuberculosis* complex isolated in Asturias from June 2004 to December 2010 using two reference molecular techniques: RFLP-IS6110 and *Spoligotyping*. Our results showed a high degree of genetic diversity, the number of types obtained by each method was 913 and 281 by RFLP-IS6110 and *Spoligotyping*, respectively. The clustering values in Asturias by RFLP-IS6110 and *Spoligotyping* were 39.3% and 86.3% respectively. The highest clustering rates were recorded in more populated areas, mostly urban. This study has allowed us to know the number, extent, and distribution of the clusters present in Asturias, in addition to knowing the most prevalent strains in our region. The percentage of unique patterns was 54.6% and 13.5 for RFLP-IS6110 and *Spoligotyping*, respectively. We differentiate cases to exogenous reinfection from endogenous reactivation in those patients who had several episodes of tuberculosis. The results obtained by RFLP-IS6110 and *Spoligotyping*, were concordant in 19.5% and discrepant in 80.5%, but we believe that the discrepancies should be interpreted considering the degree of similarity or difference in the obtained patterns. *M. tuberculosis hominis* was the most frequently isolated species (98.2%), followed by *M. bovis* (1.2%), *M. africanum* (0.3%), and *M. bovis* BCG (0.1%). We also confirmed the presence of imported strains of *M. tuberculosis* in Asturias, the molecular tools enable us also to check if they expand or become extinct. Molecular typing has helped to highlight the chains of transmission, but genotyping data must be interpreted together with epidemiologic information. Several errors due to cross-contamination intra-laboratory were detected and corrected in-time. We think that our study proved the usefulness of the simultaneous use of two molecular tools in a strategy of molecular epidemiology of TB in Asturias.

Índice

Índice

1. INTRODUCCIÓN 1

- Situación actual de la tuberculosis 3
  - Europa 7
  - España 9
  - Asturias 10
- La enfermedad tuberculosa 11
- El agente etiológico 15
- Diagnóstico de la tuberculosis 17
  - Diagnóstico de la infección tuberculosa latente 17
    - Prueba de la tuberculina 17
    - IGRAs 19
  - Diagnóstico de la enfermedad tuberculosa 23
    - Baciloscopia 23
    - Cultivo de Micobacterias 24
    - Identificación de Micobacterias 25
    - Pruebas de sensibilidad a fármacos 27
- Tratamiento de la tuberculosis 30
- Identificación de *M. tuberculosis* complex 32
  - Procedimientos convencionales de identificación de especies incluidas en el taxón *M.tuberculosis* complex 34
  - Fundamentos de los métodos moleculares para la identificación de especies del complejo tuberculoso 38
- Epidemiologia molecular de la tuberculosis 41
  - Genotipificación con endonucleasas de restricción 45
    - PGRS 45
    - RFLP-IS6110 46
  - Genotipificación mediante técnicas de amplificación genómica: PCR 48
    - DRE-PCR 48
    - FAFL 49
    - VNTR 49
    - MIRU-VNTR 50
    - *Spoligotyping* *51*
  - Patrones genéticos de las cepas que presentan alguna resistencia a fármacos 53
  - Bases de datos internacionales 54
  - Estrategias para la genotipificación de *M. tuberculosis* complex 57

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS 61

- Hipótesis de trabajo 63
- Objetivos 64

3. MATERIAL Y MÉTODOS 67

- Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* complex 69
- *Spoligotyping* 72
- RFLP-IS6110 79

4. RESULTADOS 91

- Datos demográficos de los casos de tuberculosis, Asturias 2004 – 2010 93
- Origen de las muestras a partir de las cuales se aisló *M. tuberculosis* complex 96
- Especies incluidas en el taxón *Mycobacterium tuberculosis* complex identificadas en Asturias 97
- Resultados de las pruebas de sensibilidad 97
- *Spoligotyping* 98
  - Patrones de *Spoligotyping* identificados en Asturias 100
  - Distribución de los *clusters* por áreas sanitarias 107
  - Familias de genotipos identificadas en Asturias que están presentes en las bases de datos internacionales .. 108
  - Evolución en el tiempo de los patrones genéticos identificados por *Spoligotyping* 109
  - Tasas de agrupamiento por sexo, edad, origen de la muestra y baciloscopia 111
  - Patrones huérfanos 113
  - Epidemiología de las especies 114
    - *M. bovis* 114
    - *M. bovis* BCG 116
    - *M. africanum* 117
    - Familia Beijing 118
  - Tuberculosis multirresistente 119
- RFLP-IS6110 120
  - Patrones de RFLP-IS6110 identificados en Asturias 123
  - Distribución de los *clusters* por áreas sanitarias 125
    - Área I 126
    - Área II 126
    - Área III 127
    - Área IV 128
    - Área V 129
    - Área VI 130
    - Área VII 130
    - Área VIII 131
  - Distribución geográfica de los *clusters* más significativos identificados por RFLP-IS6110 132
  - Tasas de agrupamiento por sexo, edad, origen de la muestra y baciloscopia 133
  - Patrones huérfanos 135
  - Epidemiología de las especies 135
  - Tuberculosis multirresistente 137

• Coincidencias/discrepancias entre los agrupamientos detectados por *Spoligotyping* y RFLP-IS6110 138
• Tuberculosis miliar 139
• Algunos ejemplos de la utilidad de las técnicas moleculares en diferentes contextos clínicos..... 140

5. DISCUSIÓN 151

6. CONCLUSIONES..... 171

7. BIBLIOGRAFÍA 177

8. ANEXOS 191
• Publicaciones..... 193
• Comunicaciones 198
• Otros 202

Índice de Figuras

1.1 Incidencia estimada de tuberculosis en el mundo, fuente OMS 2010. 4

1.2 Prevalencia estimada de VIH entre los casos nuevos de Tuberculosis, fuente OMS 2010. 6

1.3 Incidencia estimada de tuberculosis en Europa 2010, fuente ECDC. 8

1.4 Representación de la historia natural de la tuberculosis en un individuo a lo largo de su vida. 12

1.5 *Mycobacterium tuberculosis*. Microscopio óptico: Tinción Ziehl- Neelsen y Microscopio de fluorescencia: Tinción Auramina. 15

1.6 Colonias de *Mycobacterium tuberculosis* complex en medios de cultivo: *Middlebrook* 7H11 y Löwestein- Jensen. 16

1.7 Realización de la prueba de la Tuberculina. 18

1.8 Derivación de *M.bovis* a *M.bovis* BCG. 19

1.9 Esquema del procedimiento del QuantiFERON TB Gold In-tube 20

1.10 Esquema del procedimiento del T-SPOT.TB. 21

1.11 Interpretación de los resultados del T-SPOT.TB. 22

1.12 Localización de los *primers* en relación con los elementos de Inserción PGRS e IS6110. 49

1.13 Distribución mundial de genotipos por regiones. 55

1.14 Distribución mundial de la cepa Beijing. 56

3.1 Algoritmo diagnóstico empleado en la Unidad de Referencia Regional de Micobacterias Hospital Universitario Central de Asturias 71

3.2 Fundamentos del *Spoligotyping*. 72

3.3 Imagen de un *Miniblotter* y de la membrana preparada con los 43 oligonucleótidos. 74

3.4 Imagen de una película de *Spoligotyping*. 77

3.5 Esquema de la traducción a distintos códigos: presencia/ausencia de espaciadores, Código binario, Código octal, SITVIT. 78

3.6 Fundamentos RFLP-IS6110..... 79

3.7 Secuencia diana de *PvuII* dentro de la IS6110..... 80

3.8 Sitios de corte de distintos enzimas en la secuencia IS6110... 81

3.9 Imagen de un gel tras la electroforesis visto con luz ultravioleta 83

3.10 Imagen de la electroforesis realizada para comprobar la presencia de la banda de 245pb. 85

3.11 Lectura de la sonda en el espectrofotómetro. 86

3.12 Película de RFLP-IS6110 y posterior análisis con software *Fingerprinting Informatix II*, versión 3.0 (*BioRad*) 79

4.1 Distribución casos de tuberculosis por sexo y edad. 94

4.2 Tasas de Incidencia de tuberculosis en Asturias, desglosado por Áreas sanitarias 95

4.3 Comparación de los 281 patrones por *Spoligotyping* identificados en Asturias 106

4.4 Ejemplos de cepas emergentes. 109

4.5 Ejemplo de cepa en retroceso. 110

4.6 Ejemplo de cepa prevalente. 111

4.7 Patrones de *M. tuberculosis* identificados por RFLP-IS6110 en Asturias durante el periodo 2004-2010..... 123

4.8 Patrones de *M. tuberculosis* identificados por RFLP-IS6110 en el área Sanitaria I- (Hospital de Jarrio) 2004-2010..... 126

4.9 Patrones de *M. tuberculosis* identificados por RFLP-IS6110 en el área Sanitaria II-(Hospital Carmen y Severo Ochoa) 2004-2010 126

4.10 Patrones de *M. tuberculosis* identificados por RFLP-IS6110 en el área Sanitaria III- (Hospital San Agustín) 2004-2010... 127

4.11 Patrones de *M. tuberculosis* identificados por RFLP-IS6110 en el área Sanitaria IV- (Hospital Universitario Central de Asturias y Hospital Monte Naranco) 2004-2010..... 128

4.12 Patrones de *M. tuberculosis* identificados por RFLP-IS6110 en el área Sanitaria V-(Hopital de Cabueñes y Hospital de Jove) 2004-2010. 129

4.13 Patrones de *M. tuberculosis* identificados por RFLP-IS6110 en el área Sanitaria VI- (Hospital Grande Covián) 2004-2010. 130

4.14 Patrones de *M. tuberculosis* identificados por RFLP-IS6110 en el área Sanitaria VII- (Hospital Vital Álvarez-Buylla) 2004-2010 130

4.15 Patrones de *M. tuberculosis* identificados por RFLP-IS6110 en el área Sanitaria VIII- (Hospital Valle del Nalón) 2004-2010 131

4.16 Distribución geográfica de los *clusters* más amplios identificados por RFLP-IS6110 en Asturias, periodo 2004-2010. 132

4.17 Patrones de RFLP-IS6110 de las cepas de *M.bovis*. 135

4.18 Patrones de RFLP-IS6110 de las cepas de *M.bovis* BCG. 136

4.19 Patrones de RFLP-IS6110 de las cepas de *M.africanum*. 136

4.20 Patrones de RFLP-IS6110 de las cepas Beijing. 137

4.21 Patrones de RFLP-IS6110 de las cepas multirresistentes. 137

4.22 Patrones de RFLP-IS6110 diversos para un mismo patrón de *Spoligotyping* 138

4.23 Patrones de RFLP-IS6110 de un cluster de 15 pacientes en Avilés. 140

4.24 Patrones de RFLP-IS6110, MIRU y *Spoligotyping* correspondientes a la alerta referente a pacientes del Hospital Universitario Central de Asturias 142

4.25 Esquema que muestra la estancia de cada uno de los pacientes en las distintas habitaciones a lo largo del tiempo. 143

4.26 Patrones de *Spoligotyping* y RFLP-IS6110 de pacientes implicados en la alerta sanitaria en un Instituto de Educación Secundaria. 144

4.27 Patrones de RFLP-IS6110 de pacientes pertenecientes al Centro Penitenciario. 145

4.28 Patrones de *Spoligotyping* y RFLP-IS6110 correspondientes al ejemplo nº 5: "reactivación/reinfección". 146

4.29 Patrones de *Spoligotyping* y RFLP-IS6110 correspondientes al ejemplo nº 6: "Error intralaboratorio"..... 147

4.30 Patrones de *Spoligotyping* y RFLP-IS6110 correspondientes al ejemplo nº 7: "Dos localizaciones"..... 148

4.31 Patrones de *Spoligotyping* y RFLP-IS6110 correspondientes al ejemplo nº 8: "Patrones casi idénticos"..... 148

4.32 Patrones de *Spoligotyping* y RFLP-IS6110 correspondientes al ejemplo nº 9: "Patrones casi idénticos"..... 149

Índice de Tablas

1.1 Situación de la Tuberculosis en España 2010, fuente ECDC....9

1.2 Interpretación de los resultados del QuantiFERON TB Gold In-tube.....20

1.3 Dosis de fármacos recomendadas por la OMS y los CDC.....30

1.4 Interpretación de diferencias fenotípicas existentes entre las diferentes especies del complejo tuberculoso. 36

1.5 Diferenciación de especies del complejo tuberculoso basado en la presencia o ausencia de regiones de diferencia.....39

1.6 Genotipos más prevalentes en todo el mundo. 54

3.1 Secuencias de los 43 oligonucleótidos empleados. 73

3.2 Programa de amplificación de *Spoligotyping*.....76

3.3 Programa de amplificación de la sonda para RFLP-IS6110.....85

4.1 Número anual de casos por sexos durante el periodo junio 2004 - diciembre 2010 y Tasa de Incidencia de tuberculosis en Asturias.....93

4.2 Distribución de casos por rango de edad, periodo junio 2004- diciembre 2010. 93

4.3 Distribución de casos por sexo y rango de edad, proporción de casos hombre/mujer 94

4.4 Distribución de casos en el Principado de Asturias por Área Sanitaria, periodo junio 2004–diciembre 2010.....95

4.5 Origen de las 1255 muestras clínicas en las que se aisló e identificó *Mycobacterium tuberculosis* complex.....96

4.6 Especies incluidas en el taxón *M. tuberculosis* complex identificadas en Asturias. 97

4.7 Situación de las resistencias de *M. tuberculosis* complex a drogas de primera línea en Asturias, periodo 2004-2010. 97

4.8 *Clusters* de cepas de *M. tuberculosis* identificados en Asturias durante el periodo 2004-2010. 99

4.9 Patrones genéticos obtenidos por *Spoligotyping* de las cepas de *M. tuberculosis* aisladas en Asturias durante el periodo 2004-2010 y número de cepas que compartían cada genotipo 100

4.10 Tasa de agrupamiento, detectada por *Spoligotyping* en Asturias periodo 2004-2010, por área sanitaria. 107

4.11 Familias de genotipos con más amplia distribución a nivel mundial (SpolDB4) y su impacto en Asturias. 108

4.12 Tasa de agrupamiento, detectada por *Spoligotyping* en Asturias, por sexos. 111

4.13 Tasa de agrupamiento, detectada por *Spoligotyping* en Asturias, por rango de edad..... 112

4.14 Tasa de agrupamiento, detectada por *Spoligotyping* en Asturias, en relación a la localización de la tuberculosis. 112

4.15 Tasa de agrupamiento, detectada por *Spoligotyping* en Asturias, en relación al resultado de la baciloscopia. 113

4.16 Patrones huérfanos, detectados por *Spoligotyping* en Asturias, en relación al rango de edad. 113

4.17 Casos clínicos de *M. bovis* diagnosticados en Asturias. 115

4.18 Patrones genéticos de los aislados de *M. bovis* en Asturias.. 115

4.19 Comparación de patrones genéticos de *M.bovis* de origen humano y animal 116

4.20 Datos de los pacientes con *M.bovis* BCG 116

4.21 Patrones genéticos de los casos de *M.bovis* BCG 117

4.22 Casos clínicos de *M. africanum* tipo 1 diagnosticados en Asturias. 117

4.23 Patrones de *Spoligotyping* de las cepas de *M. africanum* tipo 1 118

4.24 Datos de los pacientes con cepas genotipo Beijing. 118

4.25 Patrones de *Spoligotyping* de las cepas genotipo Beijing. 118

4.26 Perfiles de sensibilidad de las cepas Beijing aisladas en Asturias 119

4.27 Patrones de *Spoligotyping* de las cepas multirresistentes. 119

4.28 Modificación de la tasa de agrupamiento en función de los criterios de optimización y tolerancia de la técnica RFLP-IS6110 120

4.29 *Clusters* de cepas de *M. tuberculosis* identificados por RFLP-IS6110 en Asturias durante el periodo 2004-2010, optimización 1%, tolerancia 2%. 122

4.30 Número de copias de IS6110 en las cepas de *M. tuberculosis* complex identificados por RFLP-IS6110 en Asturias durante el periodo 2004-2010. 122

4.31 Tasa de agrupamiento, detectada por RFLP-IS6110 en Asturias periodo 2004-2010, por área sanitaria. 125

4.32 Tasa de agrupamiento, detectada por RFLP-IS6110 en Asturias, por sexos. 133

4.33 Tasa de agrupamiento, detectada por RFLP-IS6110 en Asturias, por rango de edad. 133

4.34 Tasa de agrupamiento, detectada por RFLP-IS6110 en Asturias, en relación a la localización de la tuberculosis. 134

4.35 Tasa de agrupamiento, detectada por RFLP-IS6110 en Asturias, en relación al resultado de la baciloscopia. 134

4.36 Patrones huérfanos, detectados por RFLP-IS6110 en Asturias, en relación al rango de edad. 135

4.37 Datos de los pacientes pertenecientes al *cluster* del área III.. 141

Índice de Abreviaturas

AFR: África
AK: Amikacina
ATS: *American Thoracic Society*
CAM: *Central American and the Caribbean*
CAP: Capreomicina
CAS: *Central Asian*
CDC: *Centers for Disease Control*
CH: Claritromicina
CIP: Ciprofloxacino
CLO: Clofazimina
DRE-PCR: *Double Repetitive Element-PCR*
EAI: *East African-Indian*
EB: Etambutol
ECDC: *European Centre for Disease Prevention and Control*
EDO: Enfermedades de Declaración Obligatoria
EEUU: Estados Unidos
ETH: Etionamida
EUR: Europa
FAFLP: *Fluorescent Amplified- Fragment Length Polymorphism*
FEA: *Far East Asia*
HUCA: Hospital Universitario Central de Asturias
IDSA: *Infectious Diseases Society of America*
IGRAs: *Interferon Gamma- Release Assays*
INH: Isoniacida
ITL: Infección Tuberculosa Latente
IS: *Insertion Sequence*
KA: Kanamicina
LAM: *Latin-American-Mediterranean*
LCR: *Ligase Chain Reaction*
LZD: Linezolid
MECA: *Middle-East and Central Asia*
MDR-TB: *Multidrug Resistant Tuberculosis*
MIRU: *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*
MNT: Micobacterias No Tuberculosas
MO: Microscopio Óptico
NAM: *North America*
OCE: Oceanía
OMS: Organización Mundial de la Salud
ORF: *Open Reading Frames*
PAS: Ácido para-amino salicílico
PCR: *Polymerase Chain Reaction*
PGRS: *Polymorphic GC-Rich Sequence*
PPD: Protein Purificate Derivate
PZA: Pirazinamida
RFB: Rifabutina
RIF: Rifampicina
SAM: *South America*
SDA: *Strand Displacement Amplification*

SESPA: Servicio de Salud del Principado de Asturias
SIM: Sistema de Información Microbiológica de Asturias
SM: Estreptomicina
SpolDB4: *Spoligotyping DataBase 4*
ST: *Shared-Type*
TB: Tuberculosis
TCH: 2-*Thiophene carboxylic acid hydrazide*
TMA: *Transcription- Mediated Amplification*
TNF: *Tumor Necrosis Factor*
RD: *Regions of Difference*
RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*
UE: Unión Europea
VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VNTR: *Variable Number of Tandem Repeats*
WHO: *World Health Organization*
XDR-TB: *Extensively Drug-Resistant Tuberculosis*

1. Introducción

Situación actual de la Tuberculosis:

La tuberculosis es probablemente la epidemia humana más antigua, en la actualidad todavía continúa representando una amenaza para la humanidad y su control sigue suponiendo un reto difícil de alcanzar. Las principales razones por las cuales se podría explicar la situación actual de la tuberculosis en el mundo son las siguientes: 1) las desigualdades en cuanto a la calidad de vida en el mundo (un 80% de la población mundial vive en condiciones de pobreza y malnutrición); 2) la frecuente coinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que facilita la progresión y transmisión de la tuberculosis; 3) la propagación de la tuberculosis resistente a drogas de primera línea; 4) la inmigración masiva desde países donde la tuberculosis es altamente endémica a países donde esta enfermedad es infrecuente; y 5) el manejo incorrecto de los programas de control de la tuberculosis basados en la detección precoz y adherencia al tratamiento así como las deficiencias en la realización del estudio de contactos.

Las cifras son de una magnitud inusitada. La tuberculosis sigue siendo en la actualidad una de las enfermedades infecciosas con mayor tasa de mortalidad en el mundo. Un tercio de la población mundial (dos mil millones de personas) están infectadas por el bacilo de la tuberculosis, un 5-10% de ellas contraerán la enfermedad en algún momento de su vida. Según el informe anual de la OMS, *Global Tuberculosis Control 2011* [107] se estima que durante el año 2010 en todo el mundo se registraron 8,8 millones de nuevos casos de la enfermedad y 1,4 millones de muertes directamente relacionadas con la misma. La mayoría de estos casos corresponde al área del sudeste asiático; la India y China sumaron el 40% de los casos; y Africa el 24%. El resto se divide entre la región del este mediterráneo (7%), Europa (5%) y America (3%). En la Figura 1.1 se muestran de manera gráfica las tasas estimadas de tuberculosis en las diferentes regiones del mundo.

Sin embargo conviene destacar que es la primera vez que se produce un descenso en el número estimado de casos, lo que supone un cambio de tendencia, aunque muy modesto, en el impacto mundial de la tuberculosis. Los expertos relacionan este hecho con la reciente aparición de mecenazgos y fuentes de financiación, tanto de origen público como privado, que han permitido el desarrollo de nuevos test diagnósticos más rápidos y, a la vez, accesibles a poblaciones antes marginadas.

China, que en el informe de la OMS correspondiente al año 2008 ocupaba el primer lugar en cuanto al número de casos de tuberculosis, durante el periodo 1990-2010 redujo a la mitad las tasas de prevalencia; las de incidencia bajaron a razón de un 3,4% por año; y las de mortalidad se redujeron un 80%.

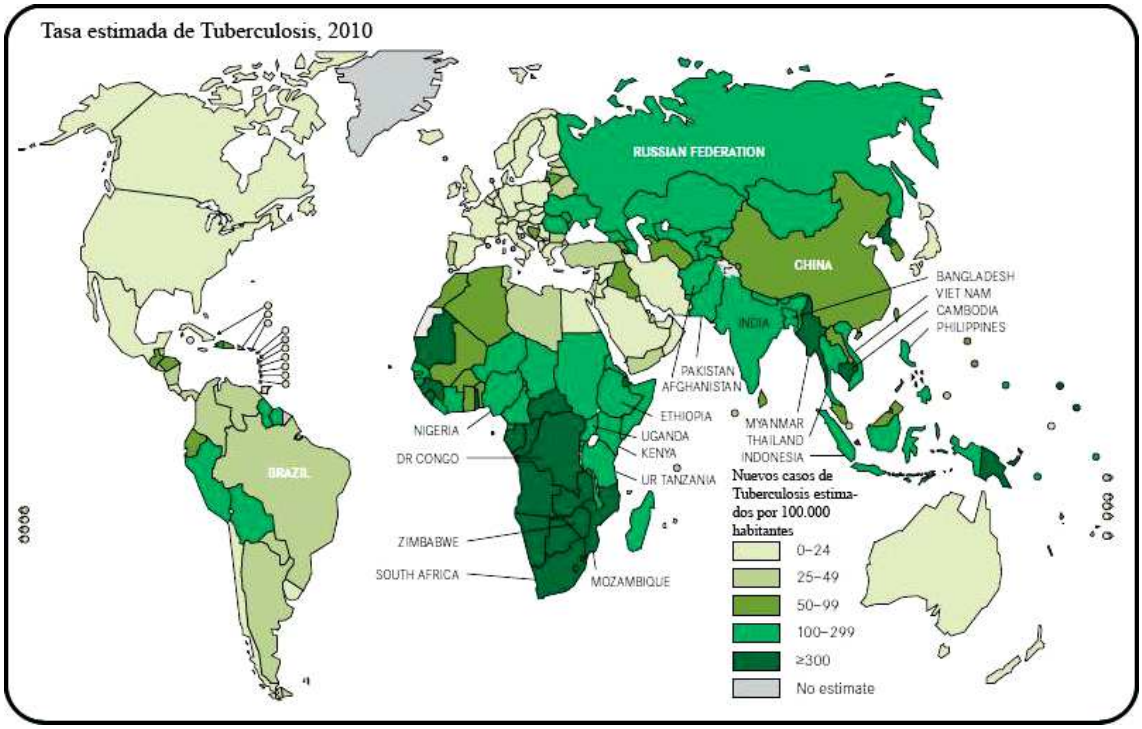


Fig. 1.1 Incidencia estimada de tuberculosis en el mundo, fuente OMS 2010

La OMS en 1991 declaró la tuberculosis una emergencia mundial y diseñó un programa para detectar el 70% de los casos y curar el 85% de los enfermos bacilíferos con tuberculosis pulmonar. Diez años después más de la mitad del planeta no había alcanzado esa meta.

En 1995 puso en marcha otro programa que bajo el epígrafe "Terapia directamente observada" [103] pretendía garantizar la adherencia al tratamiento por parte de los pacientes con la intermediación de trabajadores sanitarios y/o voluntarios que registrarían cada toma de la medicación de los enfermos. Desde la Organización se estima que con esta iniciativa, entre 1995 y 2008, se trataron correctamente 36 millones de pacientes, y se evitaron más de 6 millones de muertes. En la actualidad, con una nueva estrategia: "Plan Mundial para Detener la Tuberculosis 2006-2015" [104] se fija como objetivo que en 2015, en todo el mundo, se hayan reducido a la mitad la prevalencia y mortalidad de la tuberculosis. El solapamiento de nuevos programas e iniciativas de la OMS pone de manifiesto lo difícil que es controlar esta enfermedad, sirva de ejemplo que en el año 2000 la tuberculosis fue la octava causa de muerte a escala mundial.

En lo referente a la coinfección TB/ VIH representa el 12% de los casos en el mundo, pero existen grandes diferencias dependiendo de cada país. En los seropositivos el riesgo de desarrollar enfermedad tuberculosa se incrementa unas 34 veces. En 2010 desarrollaron tuberculosis 1,1 millones de personas seropositivas, el 82% en África (900.000 personas). En la Figura 1.2 se muestra la prevalencia estimada de VIH entre los casos nuevos de tuberculosis en las diferentes regiones del mundo en el año 2010.

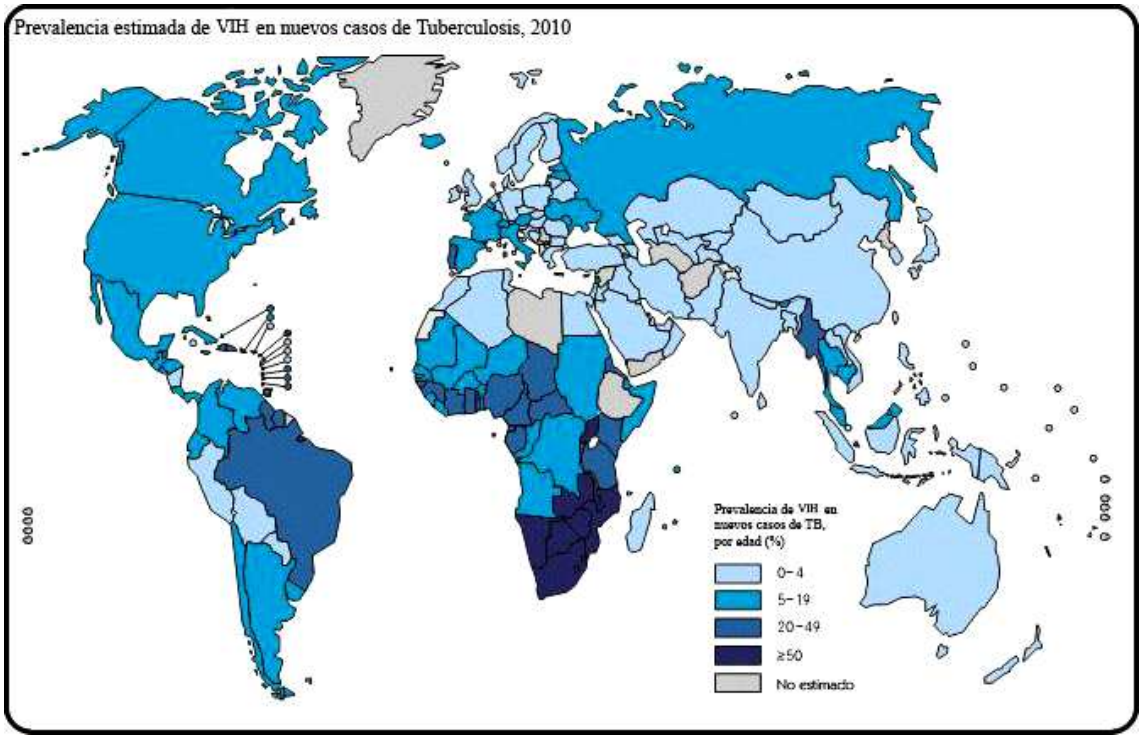


Fig. 1.2. Prevalencia estimada de VIH entre los casos nuevos de tuberculosis, fuente OMS 2010

Otro hecho que agrava, aún más si cabe, la magnitud del problema sanitario que la tuberculosis representa para la humanidad, es la propagación de los casos de tuberculosis multirresistente [32,49]. Cada año se producen 500.000 casos nuevos de tuberculosis multirresistente (MDR-TB, *multidrug-resistant tuberculosis*, resistente al menos a isoniacida y rifampicina). Casi un 50% de las MDR-TB se producen en China e India. El número de muertes por MDR-TB en 2008 fue de 150.000 personas. En mayo de 2009 la OMS en su resolución *WHA 62.15* urge a los estados miembros a alcanzar el acceso universal al diagnóstico y tratamiento de la MDR-TB y de la tuberculosis extremadamente resistente (XDR-TB, *extensively-drug-resistant tuberculosis*, cepa resistente a isoniacida-rifampicina y además a fluoroquinolonas y cualquier medicamento inyectable de segunda línea --amikacina, kanamicina y capreomicina--). En 2007, en 57 países, se informó de la existencia de al menos un caso de tuberculosis XDR-TB.

Europa:

Desde enero de 2008 el Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades (ECDC, *European Centre for Disease Prevention and Control)* y la Oficina Regional de la OMS para Europa trabajan de manera coordinada (*European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe).* En su último informe *Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2012*, se recoge que en 2010 se notificaron en la Unión Europea (UE) 73.996 casos nuevos de tuberculosis, correspondientes a los 27 Estados miembros más Islandia y Noruega. Para una población de 506.301.709 habitantes, el número de casos de tuberculosis arrojaba una tasa media de incidencia de la tuberculosis en la UE de 14,6 casos por 100.000 habitantes; con un rango que iba desde los 4,3 casos por 100.000 en Grecia, hasta los 98,2 casos por 100.000 en Rumanía. España ocupaba el noveno lugar por casos de tuberculosis (15,4) tras Rumanía (98,2), Lituania (58,2), Letonia (41,5), Bulgaria (35), Estonia (24,5), Portugal (24,7), Polonia (19,7, y Hungría (17,4), (Figura 1.3).

Un 4,6 % de las tuberculosis eran formas MDR-TB (y de ellas el 13,2% eran XDR-TB). En cuanto al porcentaje de coinfección con el VIH se situaba en el 10,6%.

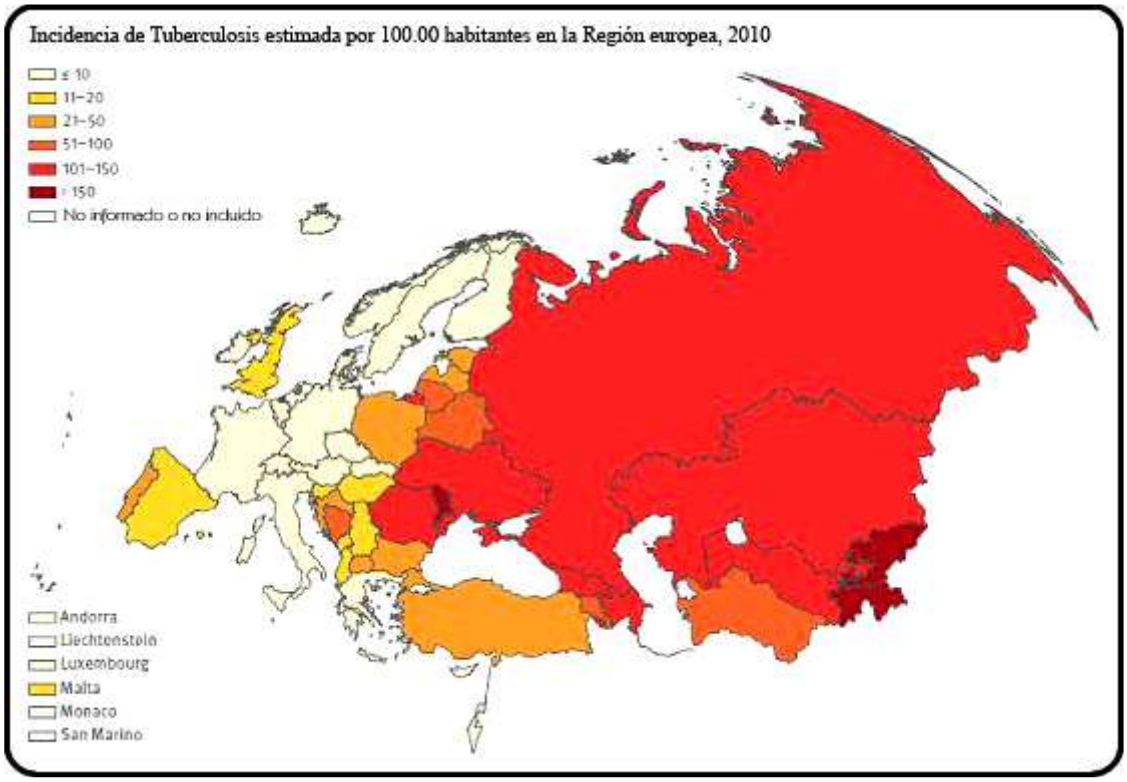


Fig. 1.3. Incidencia estimada de tuberculosis en Europa, fuente ECDC 2010

El aumento de la inmigración de los últimos años ha provocado una desaceleración en el descenso de las tasas de tuberculosis de los países más desarrollados; en países del centro y norte de Europa, más de la mitad de los casos diagnosticados pertenecen a inmigrantes. Esta situación podría interpretarse, de manera simplista, en un contexto en el que los casos en este tipo de población son siempre importados, sobre todo cuando la tuberculosis sea muy prevalente en los países de origen, pero algunos estudios publicados señalan que en población inmigrante no es tan infrecuente que la tuberculosis se deba a transmisión reciente ocasionada por cepas autóctonas del país de acogida [91].

España:

A lo largo de las dos últimas décadas la incidencia de la tuberculosis ha ido descendiendo paulatinamente, pasando de los más de 50 casos por 100.000 habitantes en 1990 a los 15,4 en 2010. Existen diferencias entre Comunidades Autónomas, y conviene tener presente que los datos no son totalmente fidedignos debido al sesgo vinculado con los casos de tuberculosis no declarados. En lo referente a la inmigración, en 1990 España era uno de los países de la UE con menor flujo de personas procedentes de otras nacionalidades, solamente un 6% de los casos de tuberculosis correspondían a población inmigrante, sin embargo en 2010 ya representaban el 32%. En la Tabla 1.1 se muestran los datos más relevantes de la tuberculosis en España correpondientes al año 2010 según el ECDC.

Spain

Total population at 1 January 2010 by EUROSTAT: 45 989 016

Tuberculosis case notifications, 2010

Total number of cases	7 089	
Notification rate per 100 000	15.4	
New & relapses (lab+) number	6 377	(90.0%)
New & relapses (lab+) notification rate per 100 000	13.9	
Pulmonary	5 238	(73.9%)
of which smear-positive	2 265	(43.2%)
Culture positive of all TB cases	3 991	(56.3%)
Mean age of new TB cases, nationals	47.2 years	
Mean age of new TB cases, non-nationals	32.9 years	
Foreign citizens of all TB cases	2 268	(32.0%)
New (not previously treated)	6 377	(90.0%)

Drug resistance surveillance & TB-HIV co-infection, 2010

Completeness of DRS data*	No	
Completeness of TB-HIV data**	Yes	
Case-linked data reporting	No	
Cases with DST results	1416	(35.5%)
Cases resistant to isoniazid	109	(7.7%)
Cases resistant to rifampicin	53	(3.7%)
MDR cases	49	(3.5%)
of which XDR cases	3	(6.1%)
Cases resistant to ethambutol	-	-
Cases resistant to streptomycin	-	-
TB cases tested for HIV	3773	(53.2%)
HIV-positive TB cases	354	(9.4%)

* National coverage 100% or culturing 90%, C+/All TB cases 50%, DST done for C+ 75%, EQA 95%

** More than 50% of TB cases tested for HIV

Tabla 1.1. Situación de la tuberculosis en España, fuente ECDC 2010

Asturias:

Los dos sistemas de recogida de información sobre tuberculosis en Asturias son el registro de Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDO) y el Sistema de Información Microbiológica de Asturias (SIM). La tuberculosis es una enfermedad de declaración obligatoria nominal. Todos los profesionales deben notificar los casos de tuberculosis diagnosticados en su ejercicio profesional (clínicos vía registro EDO, microbiólogos vía registro SIM). El SIM recoge exclusivamente los casos diagnosticados a nivel microbiológico (aislamiento y/o identificación de *M. tuberculosis* complex en las muestras clínicas de los enfermos). De acuerdo con la información del SIM, en el año 2010 la tasa de incidencia de la tuberculosis en Asturias fue de 17,5 casos por 100.000 habitantes, lo que supone una reducción del número de casos nuevos de tuberculosis a más de la mitad con respecto a la década de los 90.

La enfermedad tuberculosa :

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis* complex que se transmite vía aérea. La puerta de entrada habitual es vía pulmonar por inhalación de partículas infecciosas que el enfermo bacilífero emite a través de la tos, del estornudo o al hablar. La dosis infecciosa es muy baja; el riesgo exposición se ve condicionado por factores como: la ventilación, humedad ambiental, tiempo de exposición y virulencia de la cepa.

Una vez que el bacilo penetra en el hospedador es fagocitado por los macrófagos alveolares, ahí trata de evitar su destrucción impidiendo la unión del fagosoma que lo contiene con las bombas ATPasa como vía de escape a la acidificación y fusión con los lisosomas. De esta manera, el bacilo consigue multiplicarse en el interior del macrófago hasta el punto de destruirlo. El macrófago infectado secreta citoquinas (entre ellas el factor de necrosis tumoral TNF) y quimiocinas que desencadenan un proceso inflamatorio local y con ello una respuesta inespecífica de defensa que se caracteriza por la acumulación de neutrófilos y posteriormente de nuevos macrófagos en el foco de infección [57, 66].

Este crecimiento bacilar se ve limitado con la generación de una respuesta inmunitaria basada en la formación de linfocitos T CD4, T CD8 y linfocitos B. Los linfocitos Th1 se acumulan alrededor de los macrófagos infectados para activarlos mediante la síntesis de interferón gamma (IFN-γ). También son los responsables de la hipersensibilidad retardada, al desplazarse y proliferar en presencia de pequeñas concentraciones de proteínas de la pared celular de *M. tuberculosis* permitiendo focalizar macrófagos y linfocitos específicos alrededor del bacilo evitando su crecimiento y diseminación. Los macrófagos activados producen una acidificación y un incremento de los radicales de oxígeno y nitrógeno en el interior del fagosoma que destruye gran parte de la población bacilar, un porcentaje de esa población adapta su

metabolismo para sobrevivir en estado de latencia. El 90 % de los granulomas tuberculosos se reabsorbe en un proceso de años de evolución, pero en un 5 – 10 % de los casos se puede desarrollar la enfermedad.

M. tuberculosis es capaz de producir lesiones en el pulmón de manera directa por diseminación broncógena o, en virtud de su capacidad de persistencia intracelular, después de largos periodos de latencia. Asimismo, puede diseminarse vía linfática o vía hematógena y causar lesiones en cualquier órgano o tejido.

En la mayoría de los individuos la infección primaria no progresa, pero se produce una respuesta inmunológica en el hospedador (viraje tuberculínico) que en la mayoría de los casos permite identificar al individuo infectado. En la figura 1.4 se representa la historia natural de la tuberculosis.

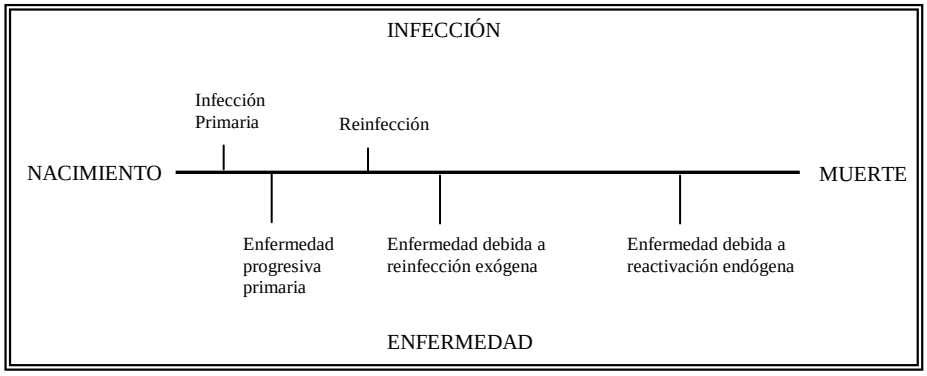


Fig. 1.4. Representación de la historia natural de la tuberculosis en un individuo a lo largo de su vida.

Tuberculosis pulmonar:

Es la localización más frecuente (80%), entre los síntomas más habituales destacan: la tos con expectoración, a veces con hemoptisis; fiebre; sudoración nocturna; anorexia y adelgazamiento. La disnea puede aparecer cuando existe derrame pleural o pericárdico asociado, o en fases avanzadas de la enfermedad por deterioro de la función pulmonar.

Se describen dos formas de tuberculosis pulmonar:

- Tuberculosis pulmonar primaria: sigue, sin solución de continuidad, a una primoinfección que a menudo pasa inadvertida.

- Tuberculosis pulmonar post-primaria: se debe a la reactivación endógena de la infección tuberculosa latente adquirida años antes.

La cavitación es uno de los hallazgos radiológicos más característicos, aunque no exclusiva de tuberculosis; la comunicación directa del foco infeccioso con las vías bronquiales convierte a esta forma de presentación en la más contagiosa para otras personas.

Tuberculosis extra-pulmonar:

Supone el 20% de los casos. Cualquier parte del cuerpo humano puede verse afectada por la tuberculosis, las localizaciones más comunes son:

Adenitis tuberculosa:

Es la forma más frecuente de tuberculosis extra-pulmonar, los bacilos pueden llegar al ganglio tanto vía linfática como hematógena. Suele presentarse como una tumoración indolora de meses de evolución.

Pleuritis tuberculosa:

Es una complicación habitual de la tuberculosis primaria debido a una progresión directa de un foco tuberculoso subpleural. No son infrecuentes las formas agudas que debutan con dolor en el costado, disnea y fiebre.

Tuberculosis osteoarticular:

La afectación vertebral es la más común (40-60%).

Tuberculosis genitourinaria:

Habitualmente es una manifestación tardía años después de la primoinfección, puede afectar a cualquier tramo de las vías genitourinarias. En ocasiones se llega al diagnóstico tras la detección de anomalías en el sedimento de orina en un contexto clínico más o menos anodino. Puede llegar a provocar lesiones renales irreversibles.

Tuberculosis miliar:

Es la forma de tuberculosis diseminada, en unas ocasiones se desarrolla de forma precoz vía linfohematógena tras la primoinfección; en otras aparece años después a partir de focos crónicos. Es una de las manifestaciones más graves. Suele observarse una siembra de pequeños nódulos amarillentos de 1-2 mm, muy numerosos, en los parénquimas afectados del organismo, histológicamente son granulomas.

Meningitis tuberculosa:

Supone un 5-10 % de las tuberculosis extra-pulmonares. Puede ser consecuencia de una siembra hematógena directa o una extensión de un foco parameníngeo contiguo al espacio subaracnoideo. Suele dejar graves secuelas neuropsíquicas y sensoriales. La mortalidad es del orden del 10-30%.

Peritonitis tuberculosa:

Habitualmente aparece en el curso de una tuberculosis miliar o por reactivación de un foco adyacente a la cavidad peritoneal.

Tuberculosis intestinal:

La zona del intestino más afectada es la ileocecal, seguida del colon ascendente y recto.

El agente etiológico:

La familia *Mycobacteriaceae* sólo tiene un género: *Mycobacterium*.

Las micobacterias, salvo algunas excepciones, son organismos aeróbicos, no forman esporas y son inmóviles. Tienen estructura bacilar curvada entre 0,2 - 0,6 µm de ancho y 1 - 10 µm de largo (Fig.1.5).

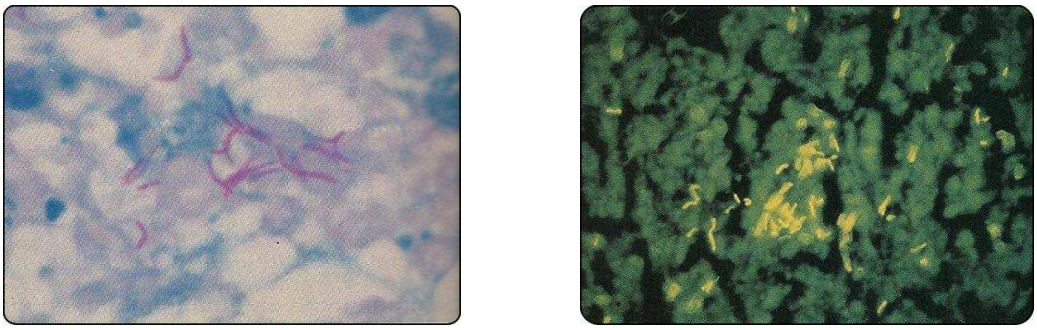


Fig.1.5. *Mycobacterium tuberculosis*, izquierda: Microscopio óptico, tinción de Ziehl-Neelsen; derecha: Microscopio fluorescencia, tinción Auramina.

Se consideran bacterias gram-positivas y son ácido-alcohol resistentes. Tienen una pared más gruesa que la de otras bacterias, muy rica en ácidos micólicos (de ahí el origen de su nombre *myco-*), hidrófoba y cerosa. La pared se divide en cuatro capas: 1) Péptido glicano, con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido N-glucolilmurámico; es la capa más interna. 2) Arabinogalactanos, están unidos a los ácidos micólicos de la tercera capa. 3) Ácidos micólicos. 4) Lípidos y mucósidos. Esta estructura es la que les confiere resistencia a algunos fármacos como la penicilina, así como la posibilidad de resistir situaciones de desecación o congelación, permitiéndoles sobrevivir en estiércol, en el suelo o sobre la superficie de objetos inanimados [48].

La mayor parte de la codificación genética de *M.tuberculosis* está dirigida a la producción de enzimas implicados en la lipogénesis y lipólisis.

Son capaces de crecer en un medio simple. El aspecto de la colonia varía tanto en textura como en color de unas especies a otras; así como la necesidad o no de luz para desarrollar pigmentación.

La velocidad de crecimiento no es uniforme entre especies, lo que permite dividirlas en "crecedoras lentas" y "crecedoras rápidas" si necesitan más o menos de 7 días respectivamente para formar colonias. La temperatura de crecimiento varía entre 25 y 40ºC, aunque la temperatura óptima es de 35-37ºC.

Runyon en 1959 clasificó a las micobacterias de acuerdo a las características fenotípicas [88]:

Grupo I: Fotocromógenas

Grupo II: Escotocromógenas

Grupo III: No cromógenas

Grupo IV: Crecedoras rápidas

Debido a la aparición continua de nuevas especies y por motivos prácticos las micobacterias a menudo se clasifican en función de las entidades nosológicas producidas:

1. Tuberculosis: *M. tuberculosis* complex
2. Lepra y úlcera de Buruli: *M. leprae* y *M. ulcerans*
3. Micobacteriosis: Micobacterias atípicas, micobacterias no tuberculosas (MNT) o micobacterias ambientales oportunistas.

M. tuberculosis es una micobacteria no cromógena, de crecimiento lento, las colonias tienen aspecto rugoso en "migas de pan" (Fig.1.6).

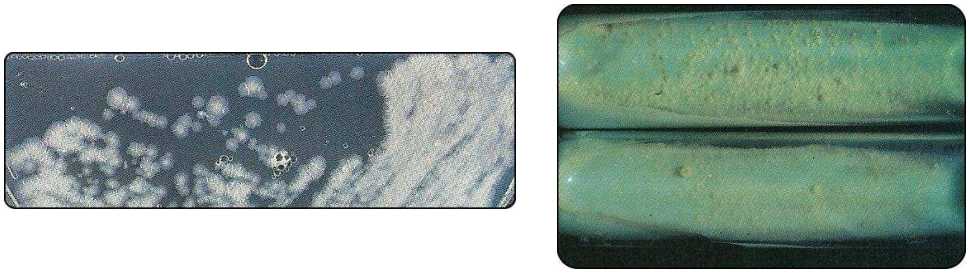


Fig. 1.6. Colonias de *Mycobacterium tuberculosis* complex, izquierda: medio de cultivo Midllebrook 7H11; derecha: Lowenstein-Jensen.

Diagnóstico de la Tuberculosis :

Debemos diferenciar dos situaciones: 1) Diagnóstico de la infección tuberculosa latente, y 2) Diagnóstico de la enfermedad tuberculosa.

Diagnóstico de la infección tuberculosa latente:

La infección tuberculosa latente (ITL) es una situación clínica que cursa sin clínica perceptible que se produce por la persistencia de *M. tuberculosis* en el organismo de individuos previamente expuestos que han sido infectados, la mayoría no desarrollarán la enfermedad pero un 5-10 % sufrirán tuberculosis meses o años más tarde. El principal objetivo del diagnóstico de la ITL será identificar clínicamente esta situación de cara a la instauración de la quimioprofilaxis.

Además de los criterios clínicos y radiológicos, tradicionalmente para el diagnóstico de la ITL se emplea la prueba de la tuberculina, en la actualidad disponemos además de pruebas diagnósticas *in vitro*, que en el ámbito internacional se reconocen bajo el acrónimo de IGRAs (*Interferon-gamma-release assays*), y que se realizan a partir de muestras de sangre heparinizada de los pacientes [62, 63].

Prueba de la Tuberculina:

Es una de las pocas pruebas diagnósticas vigentes en la medicina actual con más de un siglo de experiencia. La prueba de la tuberculina ha sido hasta hace muy pocos años el único método diagnóstico para poder detectar la infección tuberculosa latente. La primera versión aparece en 1908 presentada por Mantoux, de ahí que también se la conozca como prueba de Mantoux. Fue normalizada por la OMS en 1964.

Actualmente se administra un derivado proteico purificado tuberculínico (PPD), en España se utiliza la tuberculina PPD RT-23.

La técnica consiste en la inyección intradérmica de 2 UT en la cara anterior del antebrazo, en una zona donde no existan vasos ni lesiones cutáneas. Se debe emplear una aguja del calibre 27 con el bisel girado hacia arriba intentando que la punta quede intradérmica, la salida del líquido debe ser lenta consiguiendo una ampolla del tamaño de una lenteja, el líquido se absorberá en unos minutos. La lectura se realiza 48-72 horas después midiendo en milímetros la induración en la zona de la inyección (diámetro transversal con respecto al eje del brazo).

Fig.1.7. Realización Prueba de la Tuberculina.

Induración	Casos Positivos
≥ 5 mm	Contactos íntimos con casos índices o sospechosos. Sospechosos de enfermedad tuberculosa clínica o radiológica Infección por VIH.
≥ 10 mm	Cualquier otro caso.

El principal inconveniente de la tuberculina es que la mayoría de las proteínas presentes en el PPD no son específicas de *M. tuberculosis* lo que hace disminuir la especificidad de la prueba.

Existen reacciones cruzadas con *M. bovis* BCG en las personas vacunadas, en España durante décadas la vacunación fue masiva (se han establecido diferentes puntos de corte para diferenciar infectados de vacunados). También se producen falsos positivos en infecciones por micobacterias atípicas. La inmunodepresión es la causa más habitual de falsos negativos.

IGRAs (*Interferon-Gamma-Release Assays*):

Esta tecnología se fundamenta en la detección por enzimoinmunoensayo del interferón-gamma (IFN-γ) liberado después de una estimulación con antígenos tuberculosos específicos ESAT-6 (*early-secreted antigenic target* 6), CFP-10 (*culture filtrate protein* 10) y TB7.7 (p4). En la actualidad existen dos formatos comercializados: QuantiFERON-TB Gold In-Tube® (Cellestis) y T-SPOT.TB® (Oxford Immunotec).

Los antígenos ESAT-6 y CFP 10 utilizados en estas pruebas derivan de la región RD1 del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* complex la cual no está presente en las cepas de *M. bovis* BCG (se pierde durante la derivación de *M. bovis* a *M. bovis* BCG entre 1908 y 1921 en el Instituto Pasteur) (Figura 1.8). Esta región tampoco está presente en la mayoría de las micobacterias ambientales, con las excepciones de *M. kansasii*, *M. marinum*, y *M. szulgai* que podrían provocar reacciones cruzadas.

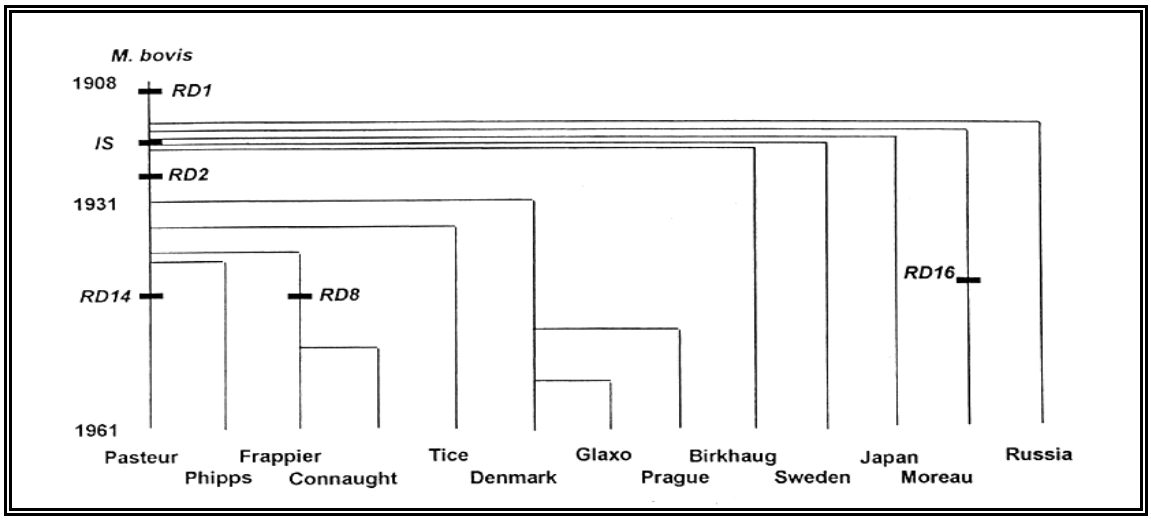


Fig. 1.8. Derivación de *M. bovis* a *M. bovis* BCG.

QuantiFERON-TB Gold-In Tube:

Este sistema emplea tres tubos específicos de recogida de sangre entera (1 ml de sangre para cada tubo), un tubo sirve como control negativo (NIL, mide la inespecificidad de la prueba), un tubo que contiene los antígenos tuberculosos específicos (TB Antigen, tubo problema) y un tubo que contiene fitohemaglutinina (Mitogen, tubo control positivo). La sangre se extrae y se incuba entre 16 y 24h a 37ºC, después se centrifugan a 3000 g durante 15 minutos, el plasma se retira y se cuantifica la cantidad de interferón gamma mediante enzimoinmunoensayo, el resultado se expresa en UI/ml (Figura 1.9 y Tabla 1.2).

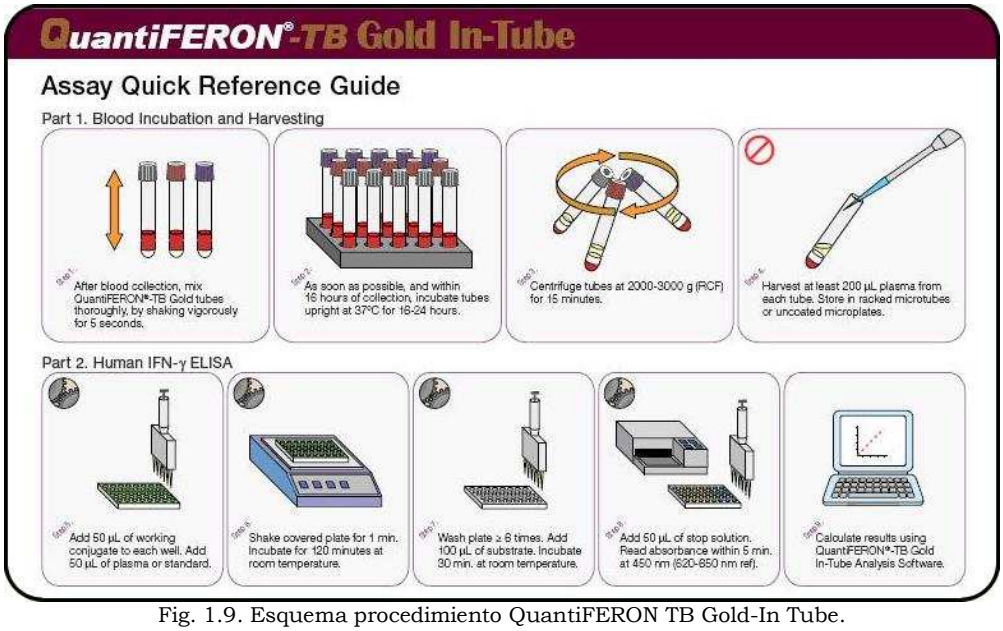


Fig. 1.9. Esquema procedimiento QuantiFERON TB Gold-In Tube.

Nil [IU/mL]	TB Antigen minus Nil [IU/mL]	Mitogen minus Nil [IU/mL][1]	QuantiFERON®-TB [IU/mL]	Report/Interpretation
≤ 8.0	< 0.35	≥ 0.5	**Negative**	*M. tuberculosis* infection NOT likely
	≥ 0.35 and < 25% of Nil value	≥ 0.5		
	≥ 0.35 and ≥ 25% of Nil value	Any	**Positive**[2]	*M. tuberculosis* infection likely
	< 0.35	< 0.5	**Indeterminate**[3]	Results are indeterminate for TB-Antigen responsiveness
	≥ 0.35 and < 25% of Nil value	< 0.5		
> 8.0[4]	Any	Any		

Tabla 1.2. Interpretación resultados QuantiFERON TB Gold In Tube.

T-SPOT.TB:

Mide la cantidad de linfocitos T que liberan interferón gamma al ponerse en contacto con los antígenos tuberculosos específicos ya citados. Se diferencia de la prueba anterior en que no se utiliza sangre total, sino que es necesario un proceso previo de separación y lavado de células mononucleares (se parte de 8 a 10 ml de sangre heparinizada). Las células mononucleares deben ajustarse a una cantidad de 250.000 células, posteriormente se incuban entre 16-24h a 37ºC en presencia de CO_2, finalmente se mide la cantidad de interferón gamma liberado mediante enzimoinmunospot que se corresponderá con el número de manchas (*spots*) obtenidos en los pocillos problema. (Figuras 1.10 y 1.11).

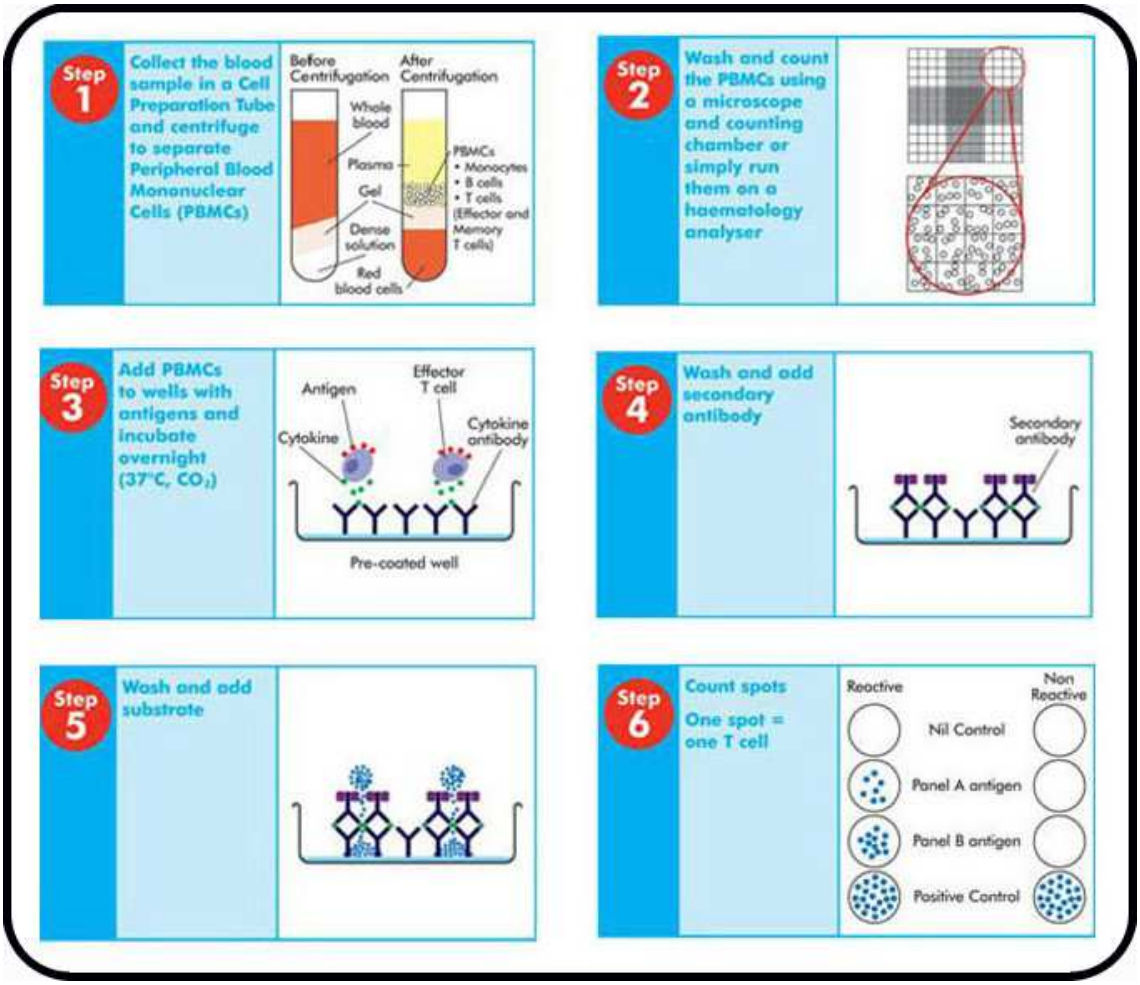


Fig. 1.10. Esquema procedimiento T-SPOT.TB.

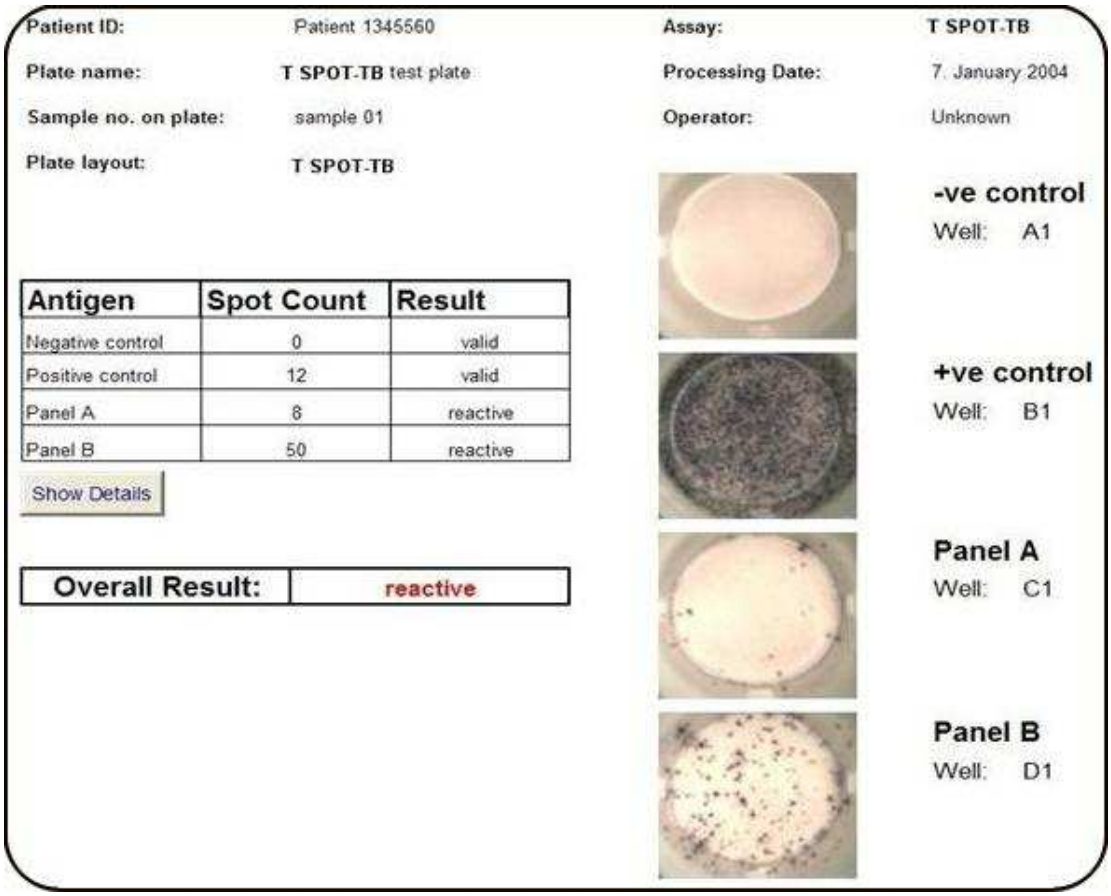


Fig. 1.11. Interpretación resultados T-SPOT.TB

Del conocimiento actual podríamos concluir [13, 24, 25, 33, 80]:

1) IGRAs y tuberculina no permiten distinguir entre infección tuberculosa y enfermedad activa; 2) IGRAs presentan una elevada especificidad, en relación a infección tuberculosa, en vacunados de 93-99%, tuberculina especificidad alta (aprox. 97%) en no vacunados y es variable o baja (aprox.60%) en vacunados; 3) Existen pocos estudios, y son muy heterogéneos, sobre sensibilidad de IGRAs en inmunodeprimidos, T-SPOT.TB parece superar a la tuberculina; 4) IGRAs tienen sensibilidad en TBC activa de 75-90% T.SPOT.TB parece más sensible que QuantiFERON y que la prueba de la tuberculina; 5) En estudios de contactos o de brotes los IGRAs se correlacionan bien con otros marcadores de exposición pero no necesariamente mejor que la tuberculina en todas las poblaciones; 6) En IGRAs están descritas conversiones y reversiones cuyo valor pronóstico se desconoce;

7) Siempre se encontrarán casos con discordancias entre IGRAs y tuberculina pero no siempre podrán ser explicadas. Parecen reducirse cuando se modifican los puntos de corte de IGRAs y de tuberculina.

Diagnóstico de la enfermedad tuberculosa:

Debemos diferenciar el diagnóstico clínico (clínica, radiología y/o anatomía patológica compatibles) que es un diagnóstico presuntivo, del diagnóstico microbiológico que es un diagnóstico etiológico definitivo que permite evidenciar la presencia del agente infeccioso específico.

El diagnóstico microbiológico convencional se sustenta en cuatro técnicas: Baciloscopia, cultivo, identificación de especie y antibiograma.

Baciloscopia:

El examen microscópico de las muestras clínicas teñidas de manera adecuada sigue siendo en la actualidad el procedimiento más simple, más barato y más rápido para proporcionar al clínico una orientación diagnóstica preliminar. Además, permite valorar la calidad de las muestras clínicas recibidas, identifica los pacientes más contagiosos y resulta útil para monitorizar la respuesta de los pacientes al tratamiento específico. Todo ello en el contexto actual de los importantes avances tecnológicos que ha experimentado la Microbiología en las tres últimas décadas.

Unos métodos de tinción emplean como colorante primario carbol fucsina (Ziehl-Neelsen) que tiñe de rojo los organismos ácido-alcohol resistentes, mientras que otros métodos utilizan como colorante primario fluorocromos (auramina) con lo que los organismos ácido-alcohol resistentes exhibirán fluorescencia de color amarillo. Aunque siempre se suele citar como ventaja de la tinción fluorescente una mayor sensibilidad con respecto a la tinción convencional de Ziehl-Neelsen, el principal propósito de la misma es más bien poder agilizar el procesamiento de grandes lotes de muestras ya que permite al microscopista invertir menos tiempo para examinar cada preparación.

De cara al diagnóstico y control de la tuberculosis los resultados positivos deberían informarse de manera inmediata por teléfono, fax o vía electrónica tan pronto como estén disponibles (nunca se debería exceder una jornada laboral desde que las muestras son recibidas en el laboratorio).

Desafortunadamente, la sensibilidad del examen microscópico es baja aunque se empleen técnicas de concentración por centrifugación, siendo un hecho que en aproximadamente la mitad de los pacientes con tuberculosis (demostrada por cultivo) el examen microscópico es persistentemente negativo. Finalmente, conviene recordar que siempre resultará arriesgado tratar de diferenciar, por su aspecto al microscopio, *M. tuberculosis* de micobacterias no tuberculosas ya que aunque se hayan descrito diferencias morfológicas, en la práctica pueden ser indistinguibles, y además hoy no está justificado ya que para ello disponemos de métodos moleculares rápidos y precisos. Asimismo, citar que existen otros microorganismos que pueden presentar diferentes grados de ácido-alcohol resistencia (*Nocardia, Rhodococcus, Tsukamurella, Gordona, Legionella micdadei* y los ooquistes de *Cryptosporidium, Isospora, Sarcocystis* y *Cyclospora*).

Cultivo de Micobacterias:

El cultivo de micobacterias ha experimentado grandes cambios y mejoras importantes. Siempre que exista una sospecha clínica de tuberculosis deben remitirse al laboratorio muestras clínicas antes de instaurar un tratamiento. Para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar no se recomiendan más de tres muestras de esputo y probablemente dos serán suficientes si se comprueba la calidad de las mismas. Las muestras de orina solamente deberían remitirse para cultivo cuando haya una clara sospecha de tuberculosis renal. Cualquier otro tipo de espécimen es apto por lo que, siempre que se plantee un diagnóstico diferencial de tuberculosis, una porción del mismo debería ser remitido al laboratorio de Microbiología.

Tradicionalmente, para el cultivo de micobacterias se han empleado mayoritariamente medios sólidos (Löwenstein-Jensen, Coletsos). A lo largo de la década de los 90 se comercializaron diferentes sistemas no radiométricos de cultivo en medio líquido; en un primer momento para procesamiento manual (Septi-Chek AFB®, MGIT®) y, posteriormente, ya totalmente automatizados (BacT/ALERT 3D®, BACTEC 9000 MB®, MGIT 960®, ESP Culture System II (actualmente Versa TreK®). Estos sistemas igualan en prestaciones al sistema radiométrico BACTEC 460 TB® (sistema semiautomático de cultivo que utiliza isótopos radiactivos y que desde los años 80 ha sido considerado como *gold standard* de las técnicas de cultivo de micobacterias pero de uso restringido a determinados laboratorios) pero presentan la ventaja de que pueden ser utilizados por cualquier laboratorio de micobacterias.

En la actualidad, se recomienda para todo tipo de muestras clínicas el uso combinado de un medio de cultivo líquido (preferiblemente automatizado) junto con uno sólido, esta asociación permite mejorar el rendimiento diagnóstico en un 20% [83].

Identificación de las Micobacterias:

Se debe tener presente que el género *Mycobacterium* engloba a más de 120 especies diferentes, más de la mitad, tanto las saprófitas como las patógenas, pueden recuperarse de los humanos y todas tienen un aspecto similar al microscopio. Los métodos tradicionales de identificación se basan en características fenotípicas, entre las que se incluyen datos morfológicos y resultados obtenidos con determinadas pruebas bioquímicas. Deben citarse como inconvenientes; la lentitud (pueden invertirse varias semanas); su laboriosidad; la inconsistencia de algunos resultados; así como el hecho de que se precisen microrganismos viables. En ocasiones, el proceso de identificación convencional puede llegar a suponer un auténtico reto para el laboratorio.

También existen métodos convencionales rápidos, como la cromatografía, que analiza la composición lipídica de la pared celular y permite la identificación de micobacterias en unas horas, pero el equipamiento es muy caro y solamente se ha utilizado en algunos centros de referencia.

La identificación de las micobacterias a partir de los cultivos, dio un giro significativo de la mano de las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos. Permiten trabajar directamente a partir de los cultivos primarios, lo que hace posible confirmar o descartar la presencia de *M. tuberculosis* complex el mismo día en que se detecta el cultivo positivo. Las plataformas comercializadas combinan la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR (*Polimerase Chain Reaction*) con la hibridación reversa lo que permite completar la identificación de las especies más comunes en patología humana en unas pocas horas de manera segura y fiable. Actualmente esta tecnología está desplazando a los métodos bioquímicos tradicionales utilizados durante décadas en los laboratorios de microbiología [28, 29,93]. Para todas aquellas especies infrecuentes o para las que no existen dispositivos comercilaizados puede recurrirse al análisis del gen 16S rDNA, la informacion contenida en el extremo 5' del mismo suele ser suficiente para permitir la identificación de la mayoría de especies bacterianas [47].

En los próximos años se esperan novedades en la identificación de micobacterias de la mano de la proteómica con la espectrometría de masas. Esta tecnología conocida como MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry-time-of-flight*) se utiliza para detectar e identificar proteínas de acuerdo al peso molecular de fragmentos específicos [98]. Actualmente ya está siendo utilizada en otros campos de la Microbiología para la identificación microbiana, los resultados preliminares parecen prometedores.

Pruebas de Sensibilidad a fármacos:

Métodos fenotípicos:

Se considera que una cepa es resistente cuando el 1% del inóculo de la población bacteriana es resistente a una concentración predeterminada de un determinado fármaco. Existen múltiples métodos para llevar a cabo este tipo de estudios 1) métodos fenotípicos convencionales (ratio de resistencias de Mitchison, concentraciones absolutas de Meisser, proporciones críticas de Canetti y Grosset); 2) adaptaciones del método de las proporciones incorporadas a los sistemas comerciales de cultivo automatizado citados previamente que, una vez que el cultivo es positivo, reducen a un periodo de 4 a 10 días el tiempo necesario para disponer del antibiograma; 3) método E-test® es también una adaptación de los métodos fenotípicos convencionales en el que destacan la gran sencillez y la fiabilidad, con resultados disponibles en 7-10 días desde que el cultivo es positivo; 4) métodos fenotípicos no convencionales (bioluminiscencia, citometría de flujo, utilización de fagos) si bien su uso no se ha generalizado.

Métodos genotípicos:

Los métodos genotípicos que se basan en la detección de mutaciones en genes que codifican la resistencia a diferentes fármacos. Permiten, en uno o dos días de trabajo, la identificación de manera precisa de resistencias a isoniacida en >75% de los casos (mutaciones en genes *katG*, *inhA*) y a rifampicina en >97% de los casos (mutación gen *rpoB*). Los métodos genotípicos presentan como ventaja añadida que pueden ser empleados directamente sobre muestras clínicas con examen microscópico positivo lo que permitiría predecir sensibilidad y/o resistencia a isoniacida-rifampicina en 48-72h desde el momento en que un paciente es atendido. Esto, hoy, es técnicamente posible.

TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN GENÓMICA

Las técnicas de amplificación genómica, permiten detectar la presencia de *M. tuberculosis* complex directamente en la muestra clínica. Son técnicas rápidas, reproducibles y altamente sensibles en las que un fragmento específico de ácidos nucleicos, presente en mayor o menor cantidad en la muestra clínica, es utilizado como molde para la síntesis enzimática *in vitro* de nuevas copias de esa secuencia diana hasta unos niveles que la hagan detectable. Todas las técnicas de amplificación genómica constan de tres fases: extracción de los ácidos nucleicos, amplificación y detección del producto amplificado. La amplificación puede lograrse con diferentes plataformas, las más utilizadas son las conocidas como: PCR (*Polymerase Chain Reaction*); TMA (*Transcription-Mediated Amplification*); LCR (*Ligase Chain Reaction*); y SDA (*strand displacement amplification*); y más recientemente PCR en tiempo real (*Real-time* PCR). Existen procedimientos "caseros" y diferentes sistemas comercializados; los primeros no son en absoluto recomendables para la rutina diagnóstica, y entre los últimos están los sistemas AMTD2® (*Amplified M. tuberculosis Direct assay*), Amplicor *M. tuberculosis* assay, DTB BD ProbeTec® (*ET Direct TB system*), INNO-LiPA Rif-TB® (*line probe assay*) y RealArt *M. tuberculosis* TM PCR kit®. Los dos primeros sistemas cuentan con la aprobación de la FDA (*United States Food and Drug Administration*).

Globalmente, los estudios evidencian una buena sensibilidad (90-100%) en muestras respiratorias con examen microscópico positivo. Sin embargo, aunque varía según la serie, la sensibilidad es baja o muy baja en muestras con examen microscópico negativo y en muestras de origen extra-pulmonar.

Existe gran debate y controversia en cuanto a cuál debería ser el uso adecuado de las técnicas de amplificación genómica en el diagnóstico de la tuberculosis [14, 25, 78, 82]. Se recomienda incorporar esta tecnología a la rutina diagnóstica en todos los casos de alta sospecha de tuberculosis.

El laboratorio debe incluir rutinariamente controles positivos y negativos en cada lote de muestras procesadas. Los resultados deben interpretarse siempre en el contexto clínico de cada paciente.

Un resultado negativo no descarta tuberculosis. Es importante recordar que pueden detectar material genético de organismos no viables, por ello no están indicadas para el control del tratamiento. La mayoría de los métodos comerciales disponibles sólo detectan *M. tuberculosis* complex, por lo que no son adecuados para diagnosticar micobacteriosis. Este tipo de tecnología complementa a la actualmente existente y no sustituye a ninguno de los procedimientos tradicionales, por ello el impacto económico debe ser tenido en cuenta.

Desde el año 2010, un nuevo formato para esta tecnología diagnóstica está revolucionando el diagnóstico de la tuberculosis y de la MDR-TB, se trata del denominado sistema Xpert MTB/RIF (*Cepheid*); basado en una *semi-nested* PCR en tiempo real con formato de cartucho compacto para uso individualizado en el que, con un mínimo procesamiento previo, se introduce la muestra clínica, y donde se llevan a cabo tanto la fase de extracción de acidos nucleicos, como las fases de amplificación genómica y detección. Todo el procesamiento dura poco más de dos horas. Los estudios publicados presentan cifras de sensibilidad y especificidad muy elevadas [10].

Tratamiento de la Tuberculosis :

En los últimos años, no han aparecido nuevos fármacos para el tratamiento de la tuberculosis y actualmente los regímenes usados son los mismos que en los años 80.

Para un enfermo que padece la enfermedad por primera vez, el tratamiento combinado que se recomienda es el siguiente [15, 65, 70, 106]:

Isoniazida (INH): 6 meses.
Rifampicina (RIF): 6 meses.
Pirazinamida (PZA): 2 primeros meses.
Etambutol (EB): 2 primeros meses.

2 (INH+RIF+PZA) + 4 (INH+RIF)

Si existe intolerancia o la cepa es resistente a alguno de los tres fármacos de primera línea se incluirá en la pauta etambutol, a la vez la duración del tratamiento debe ser mayor:

- Si no puede usarse Isoniacida: 2 (EB+RIF+PZA) + 10 (EB+RIF)
- Si no puede usarse Rifampicina: 2 (EB+INH+PZA) + 10 (EB+INH)
- Si no puede usarse Pirazinamida: 2 (EB+INH+RIF) + 7 (INH+RIF)

Fármaco	Dosis	Cantidad máxima
Isoniazida	5mg/Kg dosis diaria	300 mg
	10 mg/Kg 3 veces/semana*	900 mg
Rifampicina	10 mg/Kg diario o 3 veces/sem	600 mg
Pirazinamida	25 mg/Kg diario	2500 mg
	35 mg 3 veces/semana	2500 mg
Estreptomicina	15 mg/Kg diario o 3 veces/semana	1000 mg
Etambutol	15 mg/Kg diario	2000 mg
	30 mg/Kg 3 veces/semana	2000 mg

*La administración de fármacos 3 veces/semana requiere Terapia Directamente Observada.

Tabla 1.3. Dosis recomendadas por la OMS y los CDC.

Con los pacientes bacilíferos de manera concomitante debería pautarse aislamiento respiratorio (aproximadamente 2-3 semanas desde el inicio del tratamiento) para evitar en otras personas los riesgos inherentes a la exposición-contagio. Es fundamental concienciar al paciente de la importancia de seguir el tratamiento de forma adecuada y en su totalidad para evitar la aparición de resistencias y consiguiente fracaso terapéutico.

Las posibilidades de éxito terapéutico se reducen cuando una cepa es multirresistente (MDR-TB *Multidrug-Resistant Tuberculosis*; XDR-TB *Extensively Drug Resistant Tuberculosis*), es importante hacer una historia detallada del uso previo de fármacos antituberculosos; asimismo, se deben tener en cuenta los datos sobre la situación de las resistencias en la zona en la que reside el paciente o, si es foráneo, las propias del lugar de procedencia. Se debería contar siempre con la opinión y/o apoyo de personal experto en el tratamiento de las mismas. Se debe recurrir a los fármacos sensibles más potentes, en un número de al menos 4 ó 5 fármacos sensibles. Las pautas deben incluir al menos cuatro fármacos con cierta, o casi cierta, seguridad de su efectividad. Una vez elegida la pauta hay que seguir controles microbiológicos mensuales al menos hasta la negativización del esputo (dos cultivos consecutivos negativos en dos tandas separadas un mes), si al cuarto mes no hay respuesta se debería reconsiderar la pauta [53, 105].

Identificación de *Mycobacterium tuberculosis* complex :

El complejo tuberculoso está formado por varias especies: *M. tuberculosis, M. africanum, M. bovis, M. bovis* BCG, *M. caprae, M. canetti, M. microti, M. pinnipedi,* y más recientemente *"M. mungi"* sp. nov.

Constituyen un grupo de micobacterias de crecimiento lento que están estrechamente relacionadas a nivel de ADN (homología del 99,95%), contienen idénticas secuencias en el gen 16S rRNA, pero que difieren en términos de fenotipia y de preferencia por una determinada especie hospedadora. El complejo *M. tuberculosis* incluye por un lado cepas adaptadas al humano (*M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. canetti*, siendo este último el más divergente) y por otro cepas adaptadas a animales (*M. bovis* es la principal causa de tuberculosis en otras especies de animales, *M. microti*, *M. pinnipedi*, *M. caprae*, *M. mungi*). Algunos autores no las consideran especies independientes sino subespecies de *M. tuberculosis*.

M. tuberculosis que es la especie causante del 95 % de las tuberculosis en humanos. ***M. bovis*** es el causante de la tuberculosis en el ganado, aunque también causa el 1-3% de las tuberculosis humanas, el primer caso documentado en humanos se remonta a 1909. La infección puede ser debida a la ingestión de leche de vacas infectadas o el contacto con el ganado enfermo. Esta zoonosis juega un papel importante a la hora de luchar contra la enfermedad, ya que medidas sanitarias tan eficaces como la pasteurización de la leche y el control del ganado, habituales en los países industrializados, no lo son tanto en los países subdesarrollados lo que hace que un amplio segmento de la población mundial sea especialmente vulnerable a esta zoonosis.

M. africanum es el causante de la mayoría de los casos de tuberculosis en África. Se subdivide en dos subespecies: *M. africanum* tipo I, con una amplia distribución en las regiones del Oeste del continente africano; y *M. africanum* tipo II predominante en las regiones del Este de África. Provoca infección exclusivamente en humanos, y se comporta como oportunista en pacientes inmunodeprimidos, de ahí que sea tan común en zonas con alta incidencia de VIH.

M. caprae tiene como reservorio principal las cabras y las vacas, aunque infecta también a otros animales salvajes como son el ciervo rojo o el jabalí. En el centro de Europa es la principal causa de tuberculosis en el ganado; al igual que con *M. bovis* existe la transmisión entre animales y humanos, por lo que los ganaderos de estos países sufren "tuberculosis bovina" producida por esta micobacteria.

M. microti es el agente causal de la tuberculosis en roedores, y también se han descrito casos de infección en humanos.

M. canetti fue aislado por primera vez en 1969 por Canetti en Francia.

M. pinnipedi afecta a los pinnípedos y no se ha descrito todavía ningún caso en humanos.

M. mungi tiene como reservorio las mangostas.

Procedimientos convencionales de identificación de especies incluidas en el taxón *M. tuberculosis* complex:

Existen técnicas de identificación basadas en las diferencias fenotípicas de las distintas especies pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*. Como son: el aspecto macroscópico de las colonias, los resultados de pruebas que se fundamentan en la capacidad de crecimiento de una especie en presencia de determinadas sustancias en el medio de cultivo o la detección de productos del metabolismo micobacteriano.

Morfología de la colonia

Todas son no cromógenas y de crecimiento lento. Se aprecian diferentes morfologías de las colonias sembradas en Löwestein-Jensen:

-*M. tuberculosis*: Colonias rugosas, verrucosas, semejantes a migas de pan. No se adhieren al medio.

-*M. bovis*: Colonias diminutas, lisas, pálidas y húmedas. Se adhieren al medio.

-*M. africanum*: Colonias parecidas a las de *M. bovis*.

Prueba de la Niacina (Konno, 1956)

Todas las micobacterias producen ácido nicotínico durante su crecimiento. *M. tuberculosis* y algunos aislados de *M. africanum,* no metabolizan el ácido nicotínico y por ello lo acumulan. La niacina es excretada al medio, sobre todo en medios con base de huevo, del cual puede ser extraída y detectada. Las tiras de papel comerciales están impregnadas con cloramina y tiocianato potásico acidificado, y liberan cloruro de cianógeno, el cual reacciona con PAS (ácido para-aminosalicílico) y produce un color amarillo en presencia de niacina; en ausencia de la misma no se produce color.

Prueba del nitrato (Virtanen, 1960; Boisvert, 1961)

La presencia de la enzima nitrato-reductasa es importante para la clasificación de las micobacterias. Las micobacterias que contienen esta enzima pueden utilizar el oxígeno de los nitratos y de otros productos de reducción. La reacción química es:

$NO_3 + 2$ ë $= NO_2 + H2O$

La presencia de nitrito es detectada por la adición de sulfanilamida y N-naftiletilendiamina a pH ácido. Si el nitrito está presente se forma un compuesto rojo de diazonio

Prueba de la ureasa (Wayne, 1974; David, 1979)

Determina la capacidad del organismo para desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa, que está clasificada como una amidasa, es decir que cataliza la hidrólisis de las amidas, es capaz de romper la unión entre el carbono y el nitrógeno. La aparición de color rosa se interpreta como resultado positivo.

Apetencia de oxígeno (Marks, 1973)

Un método para diferenciar *in vitro M. tuberculosis* (aerobio) de *M. bovis* (microaerófilo) es sembrar en un medio semisólido 0,2 cm^3 de la cepa problema a partir de un cultivo maduro en Dubos Tween 80 o una suspensión similar de un cultivo joven en medio Löwestein-Jensen.

Los aerobios crecerán en la superficie y los microaerófilos en el fondo, con una banda de separación entre ambos.

Prueba de resistencia a la TCH (2-*Thiophene carboxylic acid hydrazide)* (Bonicke, 1958)

Consisten en la observación del crecimiento o inhibición de las micobacterias frente al TCH (1µg/ml). Diversos estudios han demostrado que la variedad asiática de *M. tuberculosis* es sensible a esa concentración de TCH (Yates, 1982).

También se ha demostrado la existencia de una resistencia cruzada entre TCH e isoniacida, por lo que las cepas de *M. africanum* o *M. bovis* resistentes a isoniacida lo son también a TCH (Yates, 1984).

Se siembra en un Löwestein-Jensen con TCH y otro sin droga como control. Se incuba hasta obtener buen crecimiento en el tubo control.

Control positivo: *M. tuberculosis* H37RV→ Resistente

Control negativo*: M. bovis* → Sensible

Prueba de resistencia a la Pirazinamida (Ttipathi, 1970)

Mycobacterium bovis presenta resistencia natural a la pirazinamida y una actividad pirazinamidásica defectiva. Lo que permite su diferenciación de *M. africanum* y *M. tuberculosis*.

Prueba de resistencia a la cicloserina

M. bovis BCG es resistente a la cicloserina, un fármaco antituberculoso de 2º línea.

	M. tuberculosis	***M. africanum***	***M. bovis***	***M.bovis* BCG**
Niacina	+	+	-	-
Nitratasa	+	-	-	-
Ureasa	+/-	+	+/-	+
Tipo respiratorio	Aerobio	Microaerófilo	Microaerófilo	Aerobio
TCH (5 µg/ml)	R	S	S	S
Pirazinamida	S	S	R	R
Cicloserina	S	S	S	R

Tabla. 1.4. Interpretación de diferencias fenotípicas existentes entre las diferentes especies del complejo tuberculoso.

Hace dos décadas se produjo un importante avance con la introducción de las sondas de ADN en el campo de la micobacteriología. Técnica basada en la detección de ARNr, mediante la hibridación de ADN marcado con un éster de acridina y fijado sobre un soporte sólido. La diana ARNr, se libera del citoplasma por sonicación y se une al ADN fijado formando el híbrido ADN-ARNr, que se detecta por quimioluminiscencia (*AccuProbe, Gen-Probe, BioMérieux*).

Supuso un hito sin precedentes, numerosos estudios han evidenciado una elevada sensibilidad y especificidad de esta tecnología [81].

La identificación de las especies que forman parte del complejo tuberculoso, clásicamente ha estado basada en el análisis de los resultados obtenidos de un número muy limitado de características fenotípicas (morfología, pruebas bioquímicas, velocidad de crecimiento). Esta metodología de trabajo es lenta, subjetiva en la interpretación de algunos resultados y pueden provocar, por las características de estas bacterias, errores en la identificación.

Los sondas de ADN quimioluminiscentes utilizadas en la mayoría de los laborarios de Microbiología Clínica no permiten identificar ninguna de las especies que integran el complejo tuberculoso. Una identificación incompleta de las especies del complejo tuberculoso, o las inconsistencias propias de los procedimientos de identificación fenotípicos, podrían tener repercusiones tanto desde el punto de vista epidemiológico como desde el punto de vista clínico:

-A nivel epidemiológico, la presencia de determinadas especies pasaría desapercibida y su posible impacto minimizado. Se precisan métodos de identificación que permitan identificar la totalidad de especies circulantes, lo que redundará en una mejora del conocimiento sobre la distribución de las diferentes especies en nuestro medio, lo cual de cara al futuro serviría para poder detectar cambios en los patrones de distribución, alertar sobre la aparición de cepas importadas y sus repercusiones, así como conocer el impacto real en patología humana de las zoonosis por micobacterias tuberculosas, etc.

-A nivel clínico, *M. bovis*, *M. caprae* y *M. bovis* BCG presentan resistencia de tipo constitutivo a pirazinamida. Una identificación incorrecta de las especies de este grupo podría tener como consecuencia la instauración de tratamientos inadecuados ya que, en estos casos, la

pirazinamida debería ser sustituida por etambutol o cualquier otra droga de segunda línea [39]. Otro aspecto más que hace recomendable la identificación de especies que forman parte del complejo tuberculoso son los casos de terapia con instilaciones vesicales de BCG considerado como uno de los tratamientos más efectivos y que más ventajas ofrece en la profilaxis y tratamiento del carcinoma transicional superficial de vejiga y del carcinoma *in situ*, por ello es necesario poder diferenciar de manera rápida y consistente la presencia de *M. bovis* BCG en los urocultivos de control. Si en el caso de las muestras de orina la sospecha diagnóstica puede parecer muy obvia y la necesidad de una identificación precisa secundaria, no lo es tanto cuando se producen complicaciones en otros órganos por diseminaciones generalizadas de *M. bovis* BCG.

El método idóneo para esto sería la secuenciación, pero todavía no está al alcance de la mayoría de laboratorios.

Fundamentos de los métodos moleculares para la identificación de especies del complejo tuberculoso:

Dick Van Sooligen y John. L. Ho, presentaron un estudio en 2003, "*PCR Based Method to differentiate the subspecies of the Mycobacterium tuberculosis complex on the basis of Genomic delections*" [50], en el que desarrollan una técnica para diferenciar las distintas especies del taxón *M. tuberculosis*, el método se basa en la amplificación de 7 loci y posterior visualización mediante electroforesis del tamaño del segmento amplificado. Aunque es un examen bastante completo, no diferencia entre *M. tuberculosis* y *M. africanum* II, además es una técnica bastante laboriosa, ya que requiere 7 amplificaciones por muestra.

Otro método de diferenciación de especies fue descrito en el año 2002 por Max Salfinger *et al.*, "*Rapid and Simple approach for identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis*", [84] analizaron 693 cepas para

determinar la presencia o ausencia de 6 regiones especificas: RD1, RD9 y RD10 para el estudio inicial, en aquellas en las que todavía no se puede determinar la especie, se analizan 3 regiones más: RD3, RD5 y RD11 [4].

Mycobacterium spp	**Regiones de Diferencia**					
	RD1^{BCG}	**RD4**	**RD9**	**RD12**	**RD1^{mic}**	**RD2^{seal}**
M. canetti	P	P	P	A	P	P
M. tuberculosis	P	P	P	P	P	P
M. africanum	P	P	A	P	P	A
M. microti	P	P	A	P	A	P
M. pinnipedii	P	P	A	P	P	A
M. caprae	P	P	A	A	P	P
M. bovis	P	A	A	A	P	P
M. bovis BCG	A	A	A	A	P	P
M. mungi	P	P	A	P	P	P

Presencia (P) o ausencia (A), *mediante amplificación-PCR, de las regiones de diferencia (RD) en las especies incluidas en el taxón *M. tuberculosis* complex (*5*).RD1^{BCG}: RD1-*M. bovis* BCG–específica; RD1^{mic}: RD1- *M. microti*–specifica; RD2^{seal}: RD2-*M. pinnipedii-específica.*

Tabla 1.5. Diferenciación de especies del complejo tuberculoso basado en la presencia o ausencia de regiones de diferencia

Yamamoto y Harayama [108], en 1995, describieron la utilidad del gen *gyr*B para identificar y clasificar especies de *Pseudomonas* y *Acinetobacter*. Partiendo de esta idea, en el año 2000, Kasai *et al.* [55] utilizaron esta misma diana para la identificación de las especies del complejo tuberculoso, así como para la diferenciación de otras especies de micobacterias atípicas cuyas identificaciones presentaban inconsistencias con los métodos utilizados hasta ese momento.

La secuenciación del gen *gyr*B permitió reconocer polimorfismos entre especies del taxón *M. tuberculosis* que emplearon para la identificación de especies. Kasai *et al.* encontraron cuatro variaciones sinónimas en la secuencia del gen *gyr*B entre las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*; tres de ellas son transiciones y una es una transversión. Aplicando la metodología PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*), se amplifica un fragmento del gen *gyr*B que

posteriormente se digiere con enzimas de restricción (*Rsa*I, *Taq*I, *Sac*II) lo que produce un patrón de fragmentos digeridos de longitud polimórfica característicos de una determinada especie. Esta metodología puede combinarse con otras técnicas de amplificación genómica basadas en la presencia o ausencia de una serie de regiones características de cada especie las denominadas Regiones de Diferencia (RD), las más empleadas RD1, RD2, RD4, RD9, RD10.

Actualmente, está disponible un método comercial para la identificación de especies del complejo tuberculoso (*Genotype MTBC, Hain Lifescience GMBH*, *Nehren*, *Germany*). Este sistema combina la amplificación del gen *gyr*B mediante PCR con la hibridación reversa en tiras que llevan prefijados oligonucleótidos específicos para diferentes especies de *M. tuberculosis* complex.

Sin embargo, presenta algunas limitaciones ya que no abarca todas las especies del taxón y, además, algunas identificaciones no son totalmente consistentes debido a que *M. tuberculosis*, *M. canetti* y *M. africanum* tipo II presentan idénticas secuencias del gen *gyr*B, lo que las hace indistinguiblescon esta metodología [77].

Epidemiología molecular de la tuberculosis

La epidemiología molecular es una ciencia que permite conocer la transmisión, la patogénesis y la etiología de una enfermedad en la población humana. En el campo de las enfermedades infecciosas pretende identificar la asociación de factores de riesgo con la transmisión de la enfermedad que permitan: detectar y confirmar brotes; identificar cepas de importancia en salud pública; conocer la extensión global de los patógenos, entender los mecanismos de virulencia y resistencia de diferentes cepas; mejorar el conocimiento de las dinámicas de transmisión y vías de diseminación de las enfermedades infecciosas; desarrollar estrategias para el tratamiento y la prevención de la enfermedad; así como la posibilidad de identificar contaminaciones cruzadas en los laboratorios [58, 69]. Es un área del conocimiento conceptualmente multidisciplinar, con aportaciones de la biología molecular, de la medicina clínica, de la bioestadística y de la epidemiología. Es importante no confundir el término *epidemiología molecular* con *métodos moleculares*, éstos hacen referencia exclusivamente a la tecnología empleada para diferenciar genéticamente unas cepas de un determinado microorganismo de otras.

Hasta hace poco más de una década los únicos marcadores para diferenciar unas cepas de otras eran el patrón de sensibilidad (antibiotipo), con poder discriminatorio casi nulo, y la fagotipia, con grandes limitaciones, ya que el espectro de posibles fagos detectables en los aislamientos clínicos es escaso.

Posteriormente se desarrollaron métodos basados en restricción con endonucleasas y electroforesis posterior de los fragmentos obtenidos, pero su repercusión en la práctica ha sido escasa debido al elevado número de fragmentos obtenidos. Desde que en 1998 se completó la secuenciación del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37RV por el "método *Shotgun*" o "secuenciación por fuerza bruta" [18] se han producido avances significativos.

El genoma está formado por 4.411.529 pares de bases (contenido en G+C: 61-71%) y alrededor de 4000 genes.

Comparado con el de otras familias de bacterias o virus, el genoma de *Mycobacterium* ha sido el paradigma de estabilidad genética, lo cual, en gran medida, se ha vinculado con su carencia en contenido plasmídico. La variabilidad genética constituye uno de los pilares de la adaptación y de la evolución de los seres vivos y en ella radica una buena parte de la diversidad metabólica y filogenética de los microrganismos. Asimismo juega un papel importante en las interacciones patógeno-hospedador. La habilidad de *M. tuberculosis* para persistir largos periodos de tiempo bajo un estado no replicativo, a lo que se une estar dotado de una gruesa, y a la vez compleja, pared celular, le confieren a este patógeno una elevada resistencia al *stress* que el hospedador podría generar frente a él. Aquí radica una buena parte del éxito de *M. tuberculosis* para persistir años de manera latente en un individuo y durante milenios en la población humana [56].

Las especies que integran el taxón *M. tuberculosis* comparten en 99% del genoma. La recombinación genética en micobacterias es un evento raro, las mutaciones que existen suelen ser silenciosas y, el resto, generalmente afectan a la resistencia a fármacos. Esto lleva a que se considere que cepas con el mismo genotipo tienen un antecesor común. La genotipificación de las especies pertenecientes al complejo tuberculoso sigue este principio.

La genotipificación requiere marcadores polimórficos que definan diferencias sutiles entre las diversas cepas. Estos marcadores se seleccionan en función de su tasa de mutación; si es demasiado baja (menos de 2 años) se corre el riesgo de sobreestimación, por otro lado, si es demasiado alta (más de 100 años) se producirá una subestimación [1].

Los mayores cambios son producidos por los transposones. Son fragmentos cortos de ADN, móviles, que solamente codifican las proteínas necesarias para su transposición, tienen capacidad para auto-insertarse dentro del genoma, generando polimorfismos que pueden ser utilizados para diferenciar unas cepas de otras [73].

Las Secuencias de Inserción (IS) son transposones de clase I, los transposones más simples. Su tamaño varía entre 780 pb y 2,5 kb. Las IS están ampliamente distribuidas en los organismos procariotas, se agrupan en diferentes familias de acuerdo a sus características estructurales y similitudes (IS3, IS5, IS21, IS30, IS110, etc.). Las IS pueden inducir duplicaciones, delecciones y reorganizamientos en el genoma de la bacteria, cambios que resultan esenciales para la plasticidad del genoma de las especies que integran el taxón *M. tuberculosis* complex. Cuando los elementos IS se sitúan dentro de los genes interrumpen la secuencia cifradora e inactivan la expresión del gen. Debido a su tamaño y a que algunos de ellos contienen señales terminadoras de la transcripción y traducción, los elementos IS pueden bloquear la expresión de otros genes del mismo operón que se encuentren aguas abajo del promotor del policistrón.

En 1987 se decubrió el primer elemento transponible en micobacterias, desde entonces se han identificado más de 46 secuencias de inserción, la mayoría a partir de la secuenciación del genoma de *M. tuberculosis* H37RV, pero también de otras 10 especies de micobacterias.

En la actualidad, se están secuenciando más especies lo que, probablemente, llevará a identificar nuevas secuencias de inserción. De las 46 secuencias de inserción descritas, únicamente 6 han presentado actividad: IS6100, IS6110, IS6120, IS900, IS1096 y IS1110. Estas secuencias se pueden incluir en alguna de las 17 familias que están descritas para clasificar las 443 secuencias de inserción bacteriana que

se conocen. Una de estas familias es la IS3. Los miembros de esta familia se caracterizan por su longitud, 1200-1600 pb y sus secuencias repetidas inversas (IR) que son las que flanquean a todas las secuencias de inserción, en este caso, tienen una longitud de 20-40 pb con la terminación: 5´-TG-3´. También se caracterizan por la presencia de dos solapamientos ORF (*open reading frames*): orfA y orfB, en fases 0 y -1 [49]. El elemento más representativo de esta familia es IS6110. En el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv se encuentran 16 posiciones con copias de IS6110 lo que la convierte en una herramienta epidemiológica con un gran potencial. IS6110 fue inicialmente denominada como IS986, en la actualidad se considera que las secuencias IS6110 e IS986/IS987, que son practicamente idénticas, son la misma secuencia de inserción. IS6110 tiene una longitud de 1355 pb, con IRs imperfectas de 28 pb y duplicaciones de 3 a 4 pb próximas al lugar de inserción; también tiene dos solapamientos ORF (orfA y orfB). IS6110 es específica de las especies pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* y representa la principal diana de la herramienta de referencia para el genotipado de las mismas. El genoma de *M. tuberculosis* puede contener hasta 25 copias de IS6110, solamente un número muy reducido de cepas (<1%) no presenta ninguna copia de la misma.

Para tratar de explicar el papel de estas secuencias en el genoma se han postulado dos hipótesis: la primera, compara a estos elementos con parásitos que sobreviven dentro del genoma [16]; la segunda, defiende que estos elementos son importantes para la evolución adaptativa al hospedador [9].

La presencia de IS6110 en *M. bovis* se cree que pudiera guardar relación con la adaptación de esta especie a un determinado hospedador, ya sea animal o humano.

En la acualidad, existen diferentes técnicas que permiten genotipar cepas del complejo tuberculoso, bien de forma directa mediante endonucleasas de restricción, o mediante la amplificación previa de una parte del genoma.

Genotipificación con endonucleasas de restricción

Las primeras técnicas que aparecieron se basaban en la obtención de la huella genética (*Fingerprint*). Para ello, el ADN genómico se digiere con endonucleasas de restricción y, posteriormente, los fragmentos obtenidos se separan mediante una electroforesis, lo que permite obtener un bandeo característico de cada cepa.

PGRS (*Polymorphic GC-rich sequence*)

Dos familias de genes, PE y PPE, representan el 10% del genoma de *M. tuberculosis*; se consideran la mayor fuente de variabilidad genética de la bacteria. La familia PE presenta motivos ricos de prolina y ácido glutámico (PE) en el extremo amino terminal (formado por 110 aminoácidos), en cambio la familia PPE, presenta en este extremo motivos ricos en prolina-prolina y ácido glutámico (PPE). Ambas familias, presentan variaciones de tamaño, secuencia y número de copias de secuencias repetidas en el extremo carboxilo terminal que permiten la subdivisión en subfamilias.

La familia PE se subdivide en dos familias: PE (34 miembros) y PE-PGRS (65 miembros), se diferencian en que los miembros de la subfamilia PE-PGRS tienen un dominio con numerosas repeticiones en tándem de glicina-glicina-alanina o glicina-glicina- asparragina en el extremo carboxilo terminal. Están presentes en el plásmido pTBN12. En primer lugar se digiere el ADN con la enzima *Alu*I, luego realiza una electroforesis del material digerido en gel de agarosa, posteriormente se transfiere a una membrana, a continuación se hibrida con una sonda de pTBN12 y, finalmente, se revela.

Esta técnica se emplea poco, sobre todo porque no está estandarizada, es laboriosa y porque los resultados son difíciles de interpretar. La estabilidad del plásmido pTBN12 se cifra en una media de 3,5 años.

RFLP-IS6110 (*Restriction fragment length polymorphism insertion sequence* 6110)

El hecho de que el número de copias de IS6110, y su ubicación dentro del genoma de *M. tuberculosis*, pueda diferir de unas cepas a otras, junto con la estabilidad demostrada en el tiempo, la convierten en una diana de gran utilidad para la epidemiología molecular de la tuberculosis. La secuencia de inserción IS6110 pertenece a la familia de las IS3, tiene 1355 pares de bases. La metodología basada en el número de copias y posición en el genoma de IS6110 se la reconoce como RFLP-IS6110 (*restriction fragment length polymorphism inserction sequence 6110*), fue estandarizada en 1993 [99]. A partir de ello, se han facilitado las investigaciones a nivel internacional sobre la transmisión de la tuberculosis, pudiendo conocer la distribución mundial de cepas con propiedades especiales como son: la resistencia a fármacos o cepas con mayor grado de infectividad.

El rango de aplicaciones reconocido en la literatura de esta herramienta, abarca desde su utilidad para poder diferenciar reinfección de reactivación, al estudio de brotes; o hasta incluso, poder detectar la presencia de infecciones mixtas, o confirmar/descartar contaminaciones intralaboratorio.

La técnica RFLP-IS6110 está considerada como la herramienta con mayor poder discriminativo, y representa al patrón oro (*gold standard*) de la epidemiología molecular de la tuberculosis.

Las inconvenientes se centran en los requerimientos importantes de ADN (se precisa partir de cultivos exuberantes); las dificultades para la comparación inter-laboratorio; y un bajo poder discriminativo cuando las cepas tienen menos de 6 de copias de IS6110. Asimismo, con esta técnica, las infecciones mixtas podrían ser erróneamente interpretadas como reinfecciones exógenas.

Un dilema común a los diferentes marcadores usados para la genotipificación, incluida la IS6110, es el hecho de cómo interpretar la variabilidad de los patrones. Una vez que se produce la transmisión de una cepa entre dos personas el genotipo podría cambiar. Aceptando esta premisa, y de acuerdo con diferentes estudios [76, 79, 102], la ventaja de la IS6110 como marcador para detectar transmisión reciente se sustentaría en una estabilidad media de 3,2 años. Aunque la variabilidad también dependerá del número de copias de IS6110 que presente una cepa, a más copias mayor probabilidad de que ocurran mutaciones y de que el patrón se vea alterado. El mecanismo más usado por las IS para moverse a lo largo del genoma es la transposición que sigue a la actividad enzimática codificada por las propias transposasas que ellas mismas codifican. La transposición puede generar repeticiones directas (DR *direct repeats*) de 3-4 pb flanqueando las IS, como ocurre con la IS6110.

La recombinación es asimismo otro mecanismo que contribuye a los cambios de ubicación de las IS a lo largo del genoma. Todo ello conlleva reorganizaciones del genoma, inversiones, delecciones, etc. La transposición de IS6110 no es aleatoria, existen *hotspots* para la integración en el genoma, hasta el momento se han descrito 3 *hotspots*. Se podría suponer que al haber pocos *hotspots* la variabilidad entre cepas no debería ser muy alta y que todas las copias de IS6110 tenderían a estar en esos puntos del genoma; sin embargo Warren *et al.* demostraron que los polimorfismos se deben en gran medida a que en la región próxima al *hotspot* se producen mutaciones que generan

nuevos sitios de corte para el enzima lo que conllevará diferentes patrones de RFLP. El porcentaje de transposición de la IS6110 se estima en un 18% en un periodo de 5 a 6 años, aunque parece evidente que la transposición guarda estrecha relación con los cambios en el ambiente en el que la micobacteria se desenvuelve.

En cualquier caso, independientemente del cómo, el cuándo y el porqué de la transposición, la IS6110 influye de manera directa en la plasticidad del genoma de *M. tuberculosis* complex, y orienta a que la microevolución del bacilo no ocurre solamente durante la fase de transmisión entre pacientes, sinó que también puede producirse durante el intercurso de la enfermedad en un mismo paciente.

Genotipificación mediante técnicas de amplificación genómica: PCR (*Polymerase chain reaction*)

Las técnicas de amplificación genómica tienen grandes ventajas sobre las técnicas que emplean ADN genómico no amplificado, ya que precisan mínimas cantidades de ADN y permiten trabajar incluso con microrganismos no viables, o cuando el ADN diana se encuentra mezclado con el de otros microorganismos.

DRE-PCR (*Double Repetitive Element*-PCR)

Se basa en la amplificación del fragmento existente entre dos secuencias repetitivas: IS6110 y PGRS. Son necesarios cuatro *primers* correspondientes con los 2 extremos de cada una de estas dos secuencias: Ris 1 y Ris 2 son los extremos de la secuencia IS6110 y Pntb1 y Pntb 2 son los extremos de la secuencia PGRS. Esta amplificación da un patrón de bandas característico de cada cepa que varía según el número de fragmentos amplificados y el tamaño de los mismos.

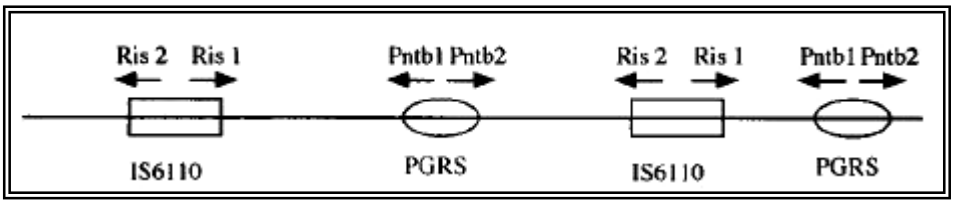


Fig 1.12. Localización de los *primers* en relación con los elementos de inserción PGRS e IS6110.

Los fragmentos se visualizan mediante electroforesis, lo que hace que éste método sea simple y rápido; además tiene un alto poder de discriminación. La parte negativa de esta técnica es su difícil reproductibilidad, lo que dificulta la comparación de patrones inter-experimento e inter-laboratorios [37].

FAFLP (*Fluorescent amplified-fragment length polymorphism)*

Estudia todo el genoma, por lo que podría ser el más discriminativo de todos. Sin embargo, requiere mucho tiempo, personal especializado, y es caro. Consiste en una doble digestión, primero con el enzima *Mse*I y luego con *Eco*RI, seguida de una fase de ligación y amplificación (uno de los *primers* utilizados va marcado con un fluoróforo). El producto amplificado se separa en un gel de poliacrilamida al 5% [45].

VNTR (*Variable numbers of tandem repeats*)

Se basa en el estudio de las repeticiones en tándem en el genoma de las micobacterias (minisatélites). Los polimorfismos se generan por adición o delección de estas secuencias repetidas.

Las secuencias se amplifican mediante PCR. El tamaño del amplicón indicará el número de secuencias repetidas que contiene, pudiendo expresarse mediante códigos numéricos fácilmente comparables e intercambiables entre diferentes laboratorios lo que permite la creación de bases de datos.

MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit - Variable Numbers of Tandem Repeats*)

Se basa en el estudio del número de repeticiones en tándem (VNTR) de una serie de elementos genéticos, de diferente clase, que se encuentran intercalados en el genoma de la micobacteria y que se denominan MIRUs (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*) [95, 96]. La genotipificación MIRU-VNTR se basa en la amplificación de las secuencias diana (inicialmente 12 loci, luego 15, y finalmente 24 loci) mediante *primers* específicos para las regiones que flanquean cada locus repetido, y en la determinación del tamaño de los amplicones, lo que se relaciona directamente con el número de copias de cada diana del MIRU-VNTR. Los polimorfismos se generan por adición o delección de estas secuencias repetidas. El tamaño de los amplicones puede determinarse por electroforesis, capilar o en gel, o por cromatografía. Entre 2 y 8 alelos por cada uno de los locus empleados como diana arrojan más de 20 millones de combinaciones posibles. La estabilidad de estas secuencias es superior a 18 meses.

El poder discriminatorio se considera intermedio entre el RFLP-IS6110 y el *Spoligotyping*, técnicamente es más simple que el RFLP-IS6110, los resultados pueden ser convertidos en códigos numéricos característicos de un determinado genotipo, y presenta un elevado potencial de cara a la automatización del procedimiento.

En el año 2006 se publicó una propuesta de estandarización que amplía a 24 el número de locus utilizando de manera combinada dianas propias del MIRU-15 y de VNTR lo que permite mejorar el poder discriminatorio de ambas técnicas por separado.

Spoligotyping

Esta técnica explota los polimorfismos que hay en el locus DR. Este locus forma parte de la familia CRISPR, cuya función es poco conocida. El locus está formado por múltiples DVR (*Direct Variant Repeats*) que a su vez estan formadas por una secuencia repetida de 36 pares de bases y una secuencia no repetida (espaciadores) de 34 a 41 pares de bases. Se han identificado 94 espaciadores, pero en la técnica de rutina sólo se utilizan 43. Las cepas varían en el número de espaciadores que están presentes o ausentes. Se amplifica toda la región DR de cada cepa problema y, posteriormente, mediante hibridación se analiza la presencia o ausencia de cada uno de los 43 espaciadores fijados a una membrana. La señal de hibridación se detecta por quimioluminiscencia.

Es el método más simple y rápido, el patrón genético se conforma por la presencia (1) o ausencia (0) de cada uno de los espaciadores estudiados, por lo que puede ser traducido a un código binario de 43 dígitos [22], éste, a su vez, es susceptible de ser reducido a un código numérico de 15 dígitos (valor octal), lo que lo hace muy manejable para alimentar no solamente las bases de datos de cada laboratorio, o de cada país, sino también bases de datos internacionales, como SpolDB4, en la que se puede consultar si una determinada cepa figura en la base de datos y, si así fuera, conocer la distribución geográfica a nivel mundial de la misma.

Es una técnica que requiere muy poca cantidad de ADN por lo que puede realizarse sin tener que esperar el crecimiento del microorganismo. Una ventaja adicional, es que permite, a la vez, diferenciar las especies del taxón *M. tuberculosis* complex, ya que todas ellas presentan por esta técnica patrones característicos.

Se la considera menos discriminativa que el RFLP-IS6110 cuando la cepa problema presenta 6 o más copias de la secuencia de inserción; y no se recomienda su uso como único método de tipificación en epidemiología molecular de la tuberculosis.

Sin embargo, resulta más discriminativa que el RFLP-IS6110 para cepas que presentan menos de 6 copias.

El locus DR es uno de los *hotspots* identificados para la inserción de la secuencia IS6110 [54, 64]. El hecho de que haya cepas idénticas mediante *Spoligotyping* y que presenten diferencias cuando se emplean otras técnicas, como RFLP-IS6110 o PGRS, indica que la región DR se mantiene estable un largo periodo de tiempo durante el cual hay reordenamientos en otras partes del cromosoma. Se dan tres posibles explicaciones para esto:

-Que las características estructurales del locus DR hacen que sea invariable o que no tenga capacidad para recombinarse, o que sufra el denominado *slipped strand misparring*.

-Que la secuencia del DR locus proporcione ventajas selectivas de tal modo que aquellos que sufran reordenamientos no persistirán en la población.

-Que se pueda adquirir la región DR de otra cepa mediante transferencia horizontal. Esta última posibilidad parece poco probable [100].

No sólo el estudio de *M. tuberculosis* es posible mediante esta técnica, sino que se utilizan para controlar el resto de especies pertenecientes al taxón *M. tuberculosis*. *M. bovis* presenta un patrón característico con ausencia de los espaciadores desde el 39 al 43. En el Reino Unido los casos por *M. bovis* representan el 1% del total [42]. Todas las cepas identificadas en humanos se cotejan con la base de datos de los Laboratorios de Veterinaria del Reino Unido (más de 15.000 cepas de *M. bovis* aisladas del ganado e identificadas por *Spoligotyping*).

El patrón genético más prevalente en las cepas aisladas en humanos coincidía con el más prevalente en las cepas aisladas en el ganado. El 59% de las personas estaba vinculado con el mundo rural, la media de edad era alta (72,3% mayores de 50 años).

Otro estudio muy parecido se realizó en Sudamérica, se incluyeron 232 cepas de *M. bovis* aisladas en diferentes especies animales (197 provenientes de ganado, 19 humanos y el resto otros animales). Con independencia de la especie portadora, se vieron patrones característicos de un área o de un país [109].

Patrones genéticos de las cepas que presentan alguna resistencia a fármacos

Hay poco estudios que hayan analizado los patrones genéticos relacionándolos con resistencias a los distintos fármacos que se utilizan en el tratamiento. La mayoría de estos estudios se centran en la cepa Beijing generalmente asociada a multirresistencia. Se cree que en aquellos países o regiones con bajas tasas de incidencia hay más variedad de mutaciones, se especula con que pudiera ser debido a que en los países con tasas altas suele haber menos variedad de cepas y, por lo tanto, menos variedad de mutaciones. O tal vez porque en esos países predominan las transmisiones recientes, frente a las reactivaciones [19, 71].

En un estudio realizado en el norte de la India, se concluye que las cepas con patrones idénticos por RFLP-IS6110 no presentaban un mismo perfil de resistencias, y viceversa [86].

En 1997 en España se investigó un *cluster* por *M. bovis* multirresistente (a la totalidad de fármacos de primera y segunda línea) que afectó a 19 pacientes de un mismo hospital entre diciembre de 1993 y febrero de 1995. Todos eran pacientes VIH-positivos, con edades comprendidas entre 24 y 54 años. Todos los pacientes finalmente murieron. Los estudios moleculares mediante RFLP-IS6110 demostraron que había dos patrones distintos (2 ó 3 copias de IS6110), estos dos grupos se mantenían mediante *Spoligotyping*, diferenciándose en un único espaciador [8].

Bases de datos internacionales

SpolDB4:

Es la 4º versión que se realiza de la base de datos mundial [11], y donde se pueden consultar patrones de *Spoligotyping* y/o MIRU-VNTR que hayan donado laboratorios de todo el mundo, o contribuir a la ampliación de la base de datos incorporando nuevos patrones cuando no figuran en la misma.

A modo de ejemplo: los 10 genotipos con más amplia distribución en todo el mundo se muestran en la tabla 1.6.

Nº de cepas*	Nombre	SIT
6412	T1	53
4051	Beijing	1
2770	Bov 2	683
2410	Bov 1	482
1930	Lam09	42
1236	H1	47
1076	CAS-1 Delhi	26
1069	X2	137
1014	EAI-5	236
956	X1	119

*datos correspondientes a 2006.

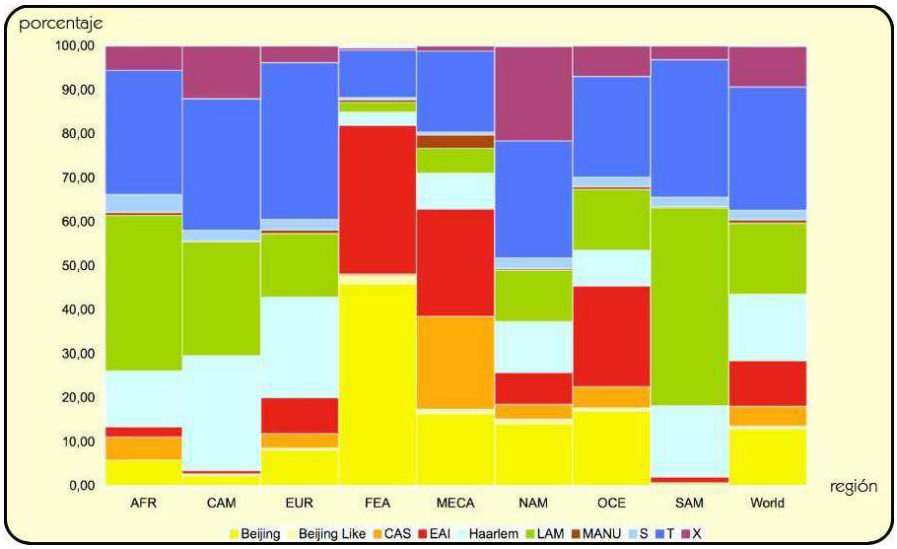
Tabla 1.6. Patrones de *Spoligotyping* más prevalentes en todo el mundo.

Sin embargo, conviene tener en cuenta que los países más desarrollados, son los que añaden más patrones a la base de datos, por lo que habrá una sobreestimación de esas cepas. El 65,5% de todas las cepas incluidas en la base de datos, pertenecen a Europa y América del Norte. América central y Oceanía, son las menos representadas, con el 3,6 % y 1,1 % de las cepas, respectivamente.

Un ejemplo de este sesgo es el hecho de que el 25- 30 % de los *M. bovis* se identifican en Europa y América del Sur y que una parte importante de los *M. africanum* son identificados en Nueva York.

El 50 % de las cepas asiáticas son del genotipo Beijing mientras que está muy poco representado en América central y del Sur, y en África, en las que predomina el genotipo LAM (50%).

En Europa predominan los genotipos Harleem y T, este último es el que está más uniformemente distribuido por todo el mundo. En la Figura 1.13 se muestra la distribución de genotipos a nivel mundial por regiones.



Abreviaturas: AFR= África, CAM = Central America and the Caribbean, EUR= Europa, FEA= Far-East Asia, MECA= Middle- East and Central Asia, NAM= North America, OCE= Oceanía y SAM= South America.

Fig. 1.13. Distribución mundial de genotipos, por regiones.

La información obtenida con las herramientas moleculares y que nutre las bases de datos, también sirve para cuestionar algunos conceptos tradicionales sobre la transmisión de la tuberculosis. Así podemos comprobar que no todas las cepas de *M. tuberculosis* tienen el mismo grado de virulencia, sino que hay cepas circulantes en el mundo que predominan sobre otras. Un ejemplo de estas cepas lo constituye la denominada cepa Beijing, endémica de China, el 86 % de las cepas aisladas en China pertenecen a esta familia, es el genotipo más prevalente en el continente asiático: Mongolia (50%); Japón (73%); Tailandia (44%); Vietnam (54%); Indonesia (34%).

En la última década se ha ido expandiendo por todo el planeta (Figura 1.14). Fue descrita en 1995 por Van Embden [101]. Tiene un patrón de *Spoligotyping* característico, ya que únicamente presenta los espaciadores del 35 al 43, por lo que es muy fácilmente detectable.

Este genotipo se asocia a multirresistencias por lo que es de vital importancia su identificación y sus dinámicas de expansión; existen numerosos estudios publicados que abordan estos aspectos. Algunos, como el realizado en Korea [17], desvinculan cualquier relación de esta cepa con la edad o sexo de los enfermos, sin embargo, otros estudios sí que encuentran una relación de la cepa Beijing con pacientes jóvenes [2]. Otro estudio realizado en Arabia Saudí durante el periodo 2002-2005, concluye que de 1505 cepas estudiadas, 67 (4,5 %) eran cepas de la familia Beijing y, que de ellas, 44 fueron aisladas en pacientes con edades comprendidas entre los 20 y los 40 años; además, el 25 % de estas cepas presentan algún tipo de resistencia, y la mitad presentan resistencia a varios fármacos [2].

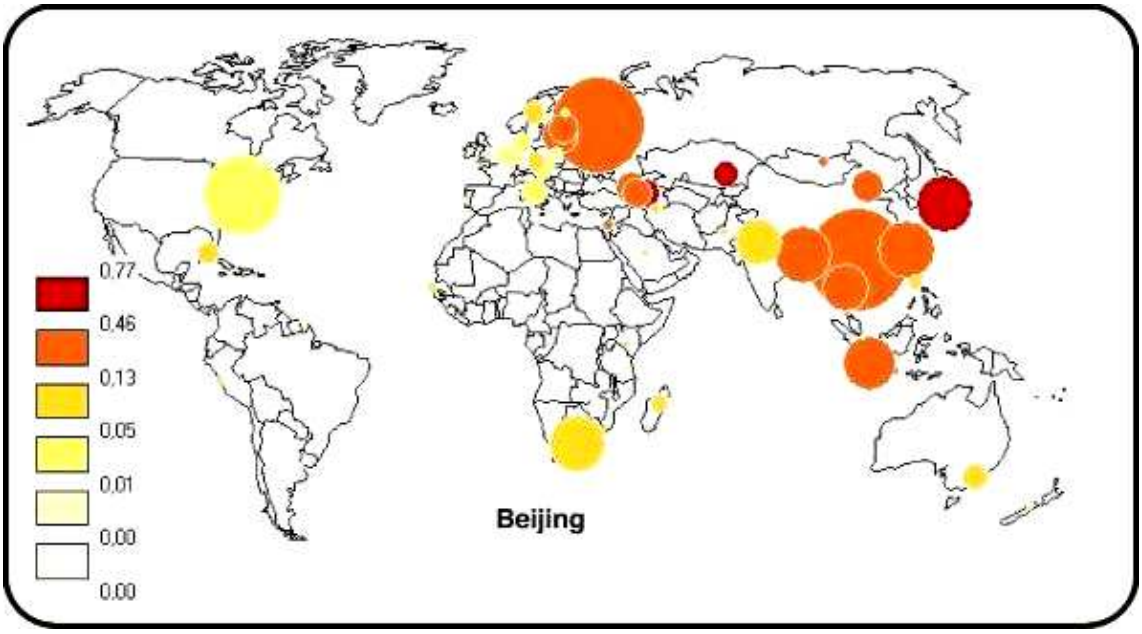


Fig 1.14. Distribución mundial de la cepa Beijing. Mostrando los números absolutos (diámetro) y porcentajes (color).

SpolDB4 también incluye información de otras especies del complejo tuberculoso:

M. microti tiene 19 cepas declaradas en la base de datos. 6 de ellas identificadas en Amsterdam, otras 6 en Londres, 4 en París y 3 en Nueva York.

M. canetti tiene sólo 6 cepas identificadas por *Spoligotyping*: 1 en Baseterre, 3 en Somalia, 1 en Berna y otra en París.

M. africanum tiene asignados varios patrones, uno de ellos (Afri1) contiene 206 cepas en la base de datos, identificadas en todo el mundo, pero principalmente en Banjul [64] y Bissau [72]. Afri2 tiene 25 cepas, la mayoría de ellas pertenecientes a países africanos y 9 de ellas en Nueva York. Afri3 sólo tiene identificadas 4 cepas, dos de ellas en el continente africano y las otras dos en Nueva York.

Estrategias para la genotipificación de *M. tuberculosis* complex

En cuanto a las tasas de agrupamiento publicadas, proceden de estudios muy variados y de diseños muy heterogéneos. Se aportan cifras que van desde un 30% hasta un 80 % en diferentes países del continente africano; o un desde un 50% hasta un 80 % en países asiáticos. Hasta cifras del orden del 40% en países con baja incidencia de tuberculosis. Conviene reseñar que la mayoría de estos estudios no incluyen a la totalidad de casos diagnosticados en esas zonas, sino que suelen ser muestreos para realizar estimaciones, con lo que se pueden estar subestimando o sobreestimando el número de casos asociados.

En España se han hecho estudios en algunas comunidades y las tasas de agrupamiento son muy variadas: Madrid (42%), Sevilla (38%), Zaragoza (39%), Segovia (27,7%), Elche (52,4%) [30, 38, 51, 89,90].

Diferenciar entre una reactivación y una reinfección exógena, Caminero *et al.* [12] estudiaron estas diferencias en la isla de Gran Canaria, analizaron 18 pacientes que enfermaron con un periodo de tiempo de más de 12 meses y comprobaron que el 44 % de los casos se debía a reinfecciones exógenas, frente a un 55% debido a reactivación. Este estudio rechaza también la idea que se tenía de que las reinfecciones exógenas generalmente se asociaban a pacientes HIV positivos.

Detectar errores intra-laboratorio. La aparición de patrones idénticos, en muestras trabajadas el mismo día en un determinado laboratorio, debería llevar a una revisión completa de la trazabilidad de los resultados emitidos para confirmar o excluir posibles errores [20, 52, 68, 87].

Detectar errores en el manejo de los pacientes. También se pueden encontrar fallos en los sistemas de control de la tuberculosis. Se deberían cumplir los requisitos de aislamiento, y de cumplimiento de la terapia [26]. Un estudio en una Unidad de Nefrología de un hospital del Reino Unido [92], revisa un *cluster* que incluía 5 pacientes que recibían tratamiento en la unidad de diálisis de dicho hospital. Se encontró que dos de estos pacientes compartieron habitación y que un tercero estaba ingresado en una sala bajo aislamiento en fechas coincidentes. El cuarto paciente, presenta un genotipo ligeramente diferente pero también había compartido habitación con el primer caso antes de ser diagnosticado.

Lo mismo le ocurría al quinto paciente, sin ser idéntico el patrón genético presentaba el mismo perfil de resistencias que la cepa del primer paciente y también había coincidido en las mismas fechas de estancia en el hospital.

Muchos otros estudios inciden en demostrar cuál es la herramienta más discriminativa [5, 43, 44, 46], en un estudio multicéntrico en el que participaron 8 laboratorios de todo el mundo [59] y en el cual se analizaron 131 cepas mediante 12 técnicas de genotipificación diferentes se concluyó que las herramientas más discriminativas eran por orden de más a menos: RFLP-IS6110; PGRS; *Spoligotyping*; y VNTR. Sin embargo, el estudio había sido realizado antes de que se propusiera la combinación de las técnicas VNTR y MIRU [97]. Estudios actuales sitúan a MIRU-VNTR con un poder discriminatorio intermedio entre RFLP-IS6110 y *Spoligotyping*.

RFLP-IS6110, MIRU-VNTR y *Spoligotyping* son en la actualidad las técnicas más empleadas en epidemiología molecular de la tuberculosis. En función de la finalidad que se persiga se podría optar por una u otra. El RFLP-IS6110, por su mayor poder discriminativo, es considerada la mejor herramienta y el patrón oro (*gold standard*) cuando aparece un brote de tuberculosis. El *Spoligotyping* es muy utilizado en estudios filogenéticos en los que se establece la distancia y la evolución de las diferentes familias conocidas hasta ahora así como su distribución geográfica.

A pesar de las ventajas o inconvenientes de una determinada técnica, en la práctica, suele ser habitual trabajar con, al menos, dos de las tres técnicas, no siendo decartable que, en determinadas situaciones, incluso sea recomendable utilizar las tres.

2. Hipotesis de trabajo y objetivos

Hipótesis de trabajo

La tuberculosis sigue siendo en la actualidad una de las enfermedades infecciosas con mayor tasa de mortalidad en el mundo. En España la incidencia de la tuberculosis ha ido descendiendo paulatinamente a lo largo de las dos últimas décadas hasta situarse en torno a los 15-20 casos por 100.000 habitantes; sin embargo, esta tasa duplica o triplica a la de otros países de nuestro entorno. Asturias se encuentra situada dentro la media española. Por lo tanto, la situación de la tuberculosis en nuestro país es susceptible de ser mejorada.

La epidemiología molecular de la tuberculosis pretende detectar y confirmar brotes; identificar cepas de importancia en salud pública; conocer la extensión global de los patógenos; mejorar el conocimiento de las dinámicas de transmisión y vías de diseminación de la enfermedad; y con ello desarrollar nuevas estrategias para luchar contra la tuberculosis.

Las técnicas moleculares: RFLP-IS6110, MIRU-VNTR y *Spoligotyping,* son en la actualidad las herramientas más empleadas en los estudios de epidemiología molecular de la tuberculosis. El RFLP-IS6110 es la de mayor poder discriminativo y está considerada como el patrón oro (*gold standard*).

Con el presente estudio nos proponemos valorar la aportación de dos técnicas moleculares de genotipificación (RFLP-IS6110 y *Spoligotyping*) dentro de una estrategia de epidemiología molecular de la tuberculosis en Asturias, con la intención final de contribuir a mejorar el conocimiento de la tuberculosis en nuestro medio. El objeto del presente trabajo serán la totalidad de cepas de tuberculosis aisladas en Asturias durante el periodo junio de 2004 a diciembre de 2010.

Objetivos

1. Implementar una estrategia de genotipificación para todas las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en Asturias.

2. Genotipar todas las cepas de *M. tuberculosis* complex aisladas en Asturias durante el periodo junio 2004-diciembre 2010 mediante dos técnicas moleculares de referencia: RFLP-IS6110 y *Spoligotyping.*

3. Conocer, con cada una de las técnicas empleadas, el número y distribución de los diferentes patrones genéticos de *M. tuberculosis* complex "circulantes" en Asturias.

4. Conocer la tasa de agrupamiento de las cepas de *M. tuberculosis* complex aisladas en Asturias, así como su distribución.

5. Identificar los *clusters* (agrupamiento de casos) presentes en Asturias. Conocer el número, la distribución, y la extensión de los mismos.

6. Identificar cepas prevalentes, cepas emergentes, y cepas con patrones "huérfanos".

7. Comparar los resultados obtenidos mediante RFLP-IS610 y *Spoligotyping*.

8. Genotipar las diferentes especies integrantes del taxón *M. tuberculosis* complex para conocer el impacto y distribución en Asturias de las mismas.

9. Detectar la entrada y/o la presencia en Asturias de cepas importadas de *M. tuberculosis* y conocer su distribución.

10. Genotipar todas las cepas MDR-TB y XDR-TB presentes en Asturias, confirmar o excluir cualquier relación epidemiológica entre las mismas, e identificar posibles casos secundarios.

11. Identificar otras cepas de importancia en salud pública, en relación al número de casos que agrupan, tipo de pacientes afectados, o por la distribución más o menos peculiar de las mismas.

12. Detectar errores intra-laboratorio.

13. Diferenciar entre reactivación y reinfección en aquellos pacientes en los que estén disponibles las cepas de los diferentes episodios de tuberculosis.

14. Proponer una estrategia de utilización de las herramientas moleculares en el contexto de la epidemiología molecular de la tuberculosis en Asturias.

3. Material y métodos

Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* complex :

El presente estudio incluye la totalidad de aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* en las 8 áreas sanitarias del Principado Asturias durante el periodo comprendido entre junio de 2004 y diciembre de 2010. Las cepas fueron aisladas en los diferentes laboratorios de Microbiología del SESPA, y las fueron remitiendo de manera regular a la Unidad de Referencia Regional de Micobacterias del HUCA.

Procesamiento de las Muestras clínicas:

Las cepas provenientes de otros laboratorios de microbiología del SESPA fueron aisladas según los procedimientos propios de la rutina de trabajo de cada uno de esos centros. Una vez registrada la cepa, todos los procedimientos se llevaron a cabo de manera idéntica a lo descrito para las cepas del HUCA.

En el caso de la Unidad de Referencia Regional de Micobacterias se aplicó la metodología diagnóstica que se muestra resumida de manera esquemática en la Figura 3.1.

La mayoría de las muestras clínicas remitidas al laboratorio para descartar micobacterias proceden del tracto respiratorio donde existe una compleja matriz orgánica colonizada con una gran variedad de microorganismos que hace necesario recurrir a un pre-tratamiento adecuado de las muestras para eliminar la microbiota acompañante no deseada (descontaminación-digestión, homogenización y concentración por centrifugación). En nuestro caso para el pre-tratamiento de las muestras se empleó el preparado comercial Mycoprep (*Becton-Dickinson*) basado en el método desarrollado por Kubica (N-acetil-L-cisteína + hidróxico sódico al 2%).

Se utilizaron tres tipos de medios de cultivo: uno sólido (Löwestein-Jensen) y dos líquidos de lectura automatizada (Sistema MB/Bact ALERT 3D y BACTEC MGIT 960- *Mycobacterial Growth Indicator Tube*-).

La identificación preliminar se realizó mediante sondas de ADN quimioluminiscentes (Accuprobe) específicas para *M. tuberculosis* complex.

A todos los aislamientos se les realizaron pruebas de sensibilidad a fármacos antituberculosos.

Todas las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* complex incluidas en el presente estudio (una por paciente y por localización de la tuberculosis) pasaron a formar parte de un cepario, donde se mantienen congeladas a -70ºC. Asimismo, una alícuota de cada cepa fue empleada para extraer el ADN y generar un segundo archivo, el material genético se mantiene a -20ºC.

Laboratorio de Micobacterias. Algoritmo diagnóstico

Unidad de Referencia Regional de Micobacterias. Hospital Universitario Central de Asturias

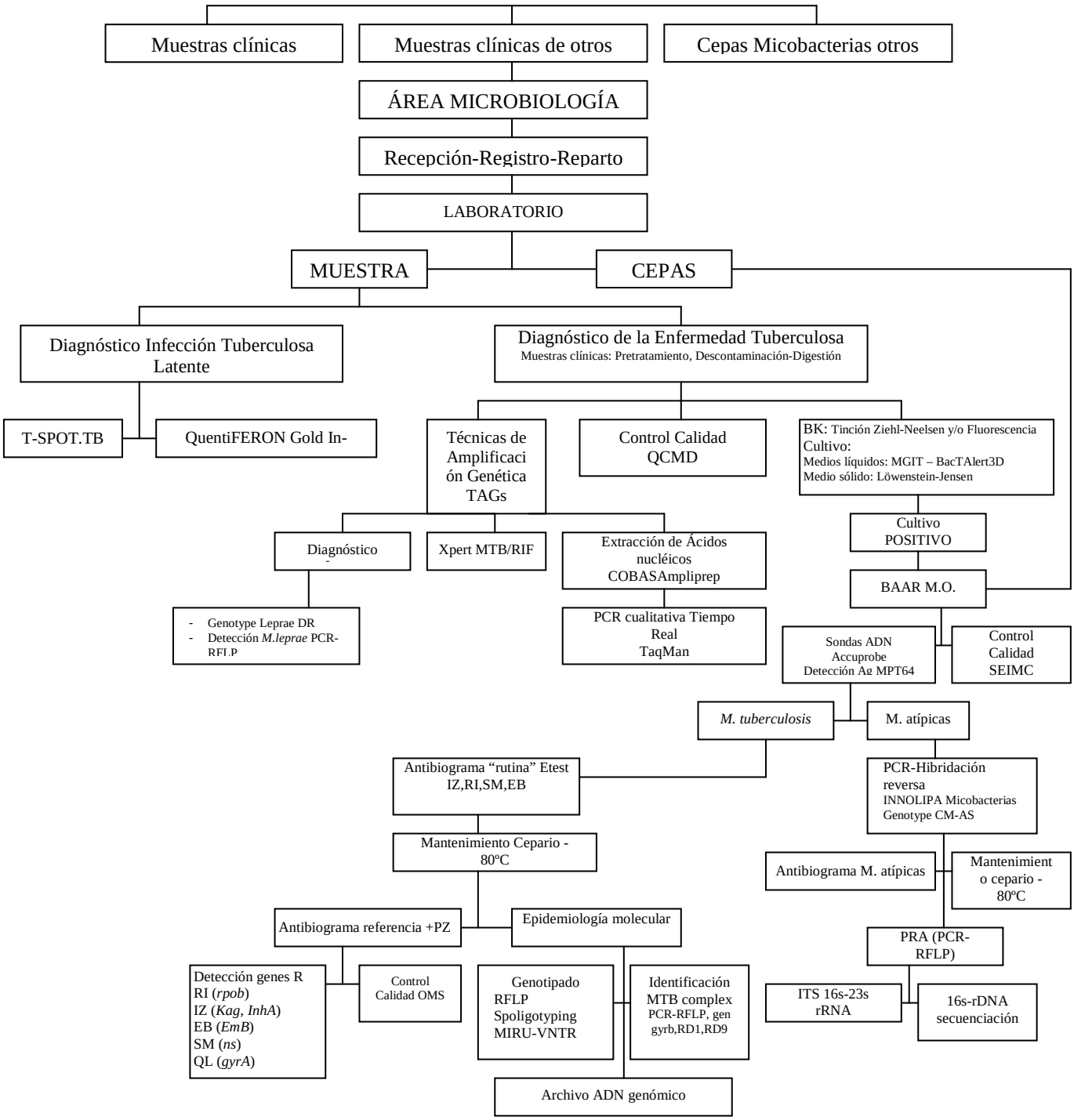


Fig. 3.1. Algoritmo diagnóstico de la Unidad de Referencia Regional de Micobacterias. Hospital Universitario Central de Asturias

Las técnicas diagnósticas empleadas para llevar a cabo el presente estudio, y que se describen a continuación, comenzaron a realizarse de manera prospectiva a partir del otoño de 2008; para el procesamiento de las cepas pertenecientes al periodo anterior (2004–2008), se recurrió en unos casos al cepario y en otros al archivo de ADN comentados previamente.

Spoligotyping

Se siguió el protocolo descrito por J. Kamerbeek et al.

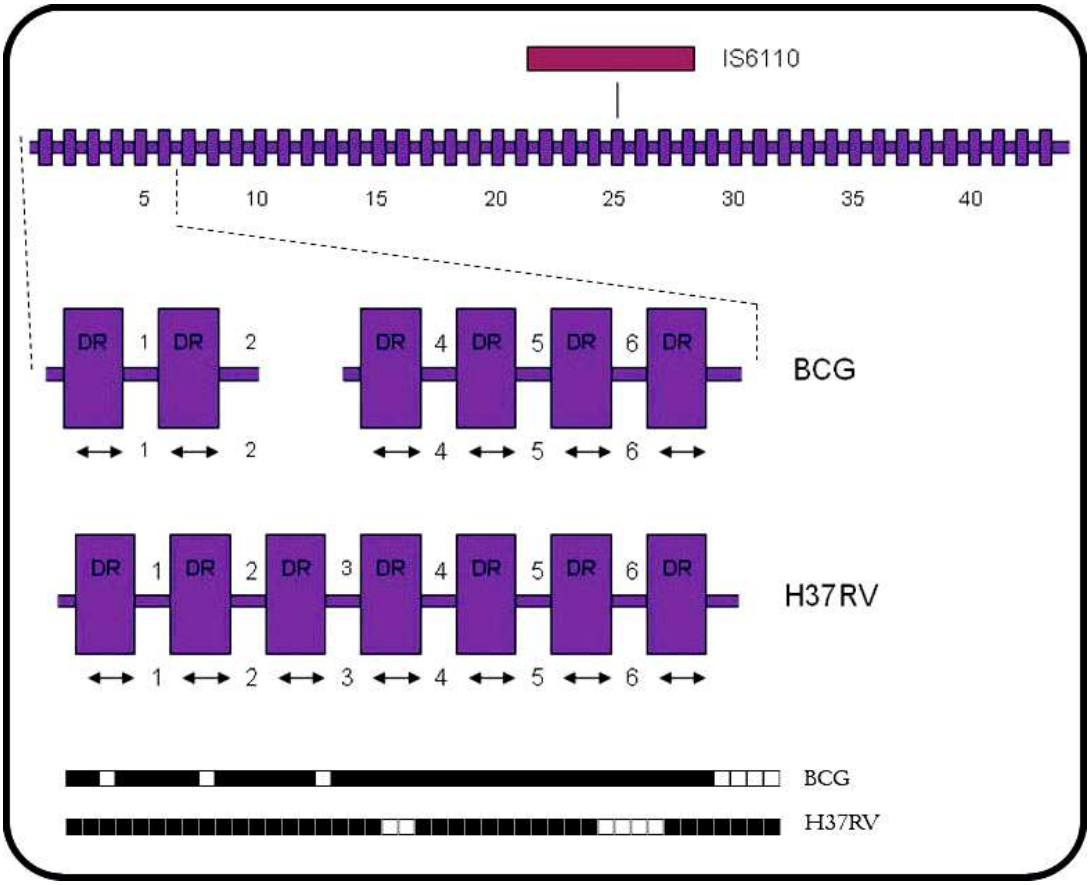


Fig. 3.2. Fundamentos del *Spoligotyping* [7]

Preparación de la membrana:

Se utiliza una membrana *Biodine* C 20x20 se recorta para adaptarla a las dimensiones del *Miniblotter MN45*. Se identifica la cara de la membrana que va a ser expuesta haciendo un corte en la esquina superior-derecha.

Se enrolla la membrana *Biodine* C 20x20 dentro de un tubo de hibridación. Se incuba 10 min a T.A. con 10 ml de una solución reciente de EDAC 16% (w/v, 1,6 g EDAC/10 ml H_2O). Se lava con agua a T. A. durante 2 minutos.

Oligonucleótidos:

Se diluyen los 43 oligonucleótidos (Tabla 3.1) hasta una concentración 0,125 µM en $NaHCO_3$ 500mM (10,5 g $NaHCO_3$ en 250 ml de H_2O) (los oligonucleótidos una vez adquiridos se reconstituyen con el volumen necesario, de tampón TE o agua destilada, para obtener una concentración stock de 100 µM y se almacenan a –20ºC).

Nº de espaciador	Secuencia de Oligonucleotidos	Nº de espaciador	Secuencia de Oligonucleotidos
1	ATAGAGGGTCGCCGGTTCTGGATCA	23	AGCATCGCTGATGCGGTCCAGCTCG
2	CCTCATAATTGGGCGACAGCTTTTG	24	CCGCCTGCTGGGTGAGACGTGCTCG
3	CCGTGCTTCCAGTGATCGCCTTCTA	25	GATCAGCGACCACCGCACCCTGTCA
4	ACGTCATACGCCGACCAATCATCAG	26	CTTCAGCACCACCATCATCCGGCGC
5	TTTTCTGACCACTTGTGCGGGATTA	27	GGATTCGTGATCTCTTCCCGCGGAT
6	CGTCGTCATTTCCGGCTTCAATTTC	28	TGCCCCGGCGTTTAGCGATCACAAC
7	GAGGAGAGCGAGTACTCGGGGCTGC	29	AAATACAGGCTCCACGACACGACCA
8	CGTGAAACCGCCCCCAGCCTCGCCG	30	GGTTGCCCCGCGCCCTTTTCCAGCC
9	ACTCGGAATCCCATGTGCTGACAGC	31	TCAGACAGGTTCGCGTCGATCAAGT
10	TCGACACCCGCTCTAGTTGACTTCC	32	GACCAAATAGGTATCGGCGTGTTCA
11	GTGAGCAACGGCGGCGGCAACCTGG	33	GACATGACGGCGGTGCCGCACTTGA
12	ATATCTGCTGCCCGCCCGGGGAGAT	34	AAGTCACCTCGCCCACACCGTCGAA
13	GACCATCATTGCCATTCCCTCTCCC	35	TCCGTACGCTCGAAACGCTTCCAAC
14	GGTGTGATGCGGATGGTCGGCTCGG	36	CGAAATCCAGCACCACATCCGCAGC
15	CTTGAATAACGCGCAGTGAATTTCG	37	CGCGAACTCGTCCACAGTCCCCCTT
16	CGAGTTCCCGTCAGCGTCGTAAATC	38	CGTGGATGGCGGATGCGTTGTGCGC
17	GCGCCGGCCCGCGCGGATGACTCCG	39	GACGATGGCCAGTAAATCGGCGTGG
18	CATGGACCCGGGCGAGCTGCAGATG	40	CGCCATCTGTGCCTCATACAGGTCC
19	TAACTGGCTTGGCGCTGATCCTGGT	41	GGAGCTTTCCGGCTTCTATCAGGTA
20	TTGACCTCGCCAGGAGAGAAGATCA	42	ATGGTGGGACATGGACGAGCGCGAC
21	TCGATGTCGATGTCCCAATCGTCGA	43	CGCAGAATCGCACCGGGTGCGGGAG
22	ACCGCAGACGGCACGATTGAGACAA		

Tabla 3.1. Secuencias de los 43 oligonucleótidos empleados (*Thermo Fisher Scientific)* [54]

Activación de la membrana:

Se pasa la membrana al *Miniblotter*. Se coloca una almohadilla (*plastic cushion*) nueva debajo de la membrana. Se aprietan los tornillos de sujección hasta el tope.

Se rellenan los pocillos (números 2 al 44 incluidos) con 150 µl de solución de cada uno de los 43 oligos previamente diluidos.

Los pocillos números 1 y 45 se rellenarán con tinta china diluida 1/100 en SSPE 2X (100 ml SSPE 20X + 900 ml H_2O).

Se incuba 1minuto a T.A, luego se aspiran todos los pocillos y se desecha el contenido.

A continuación se saca la membrana del *Miniblotter*.

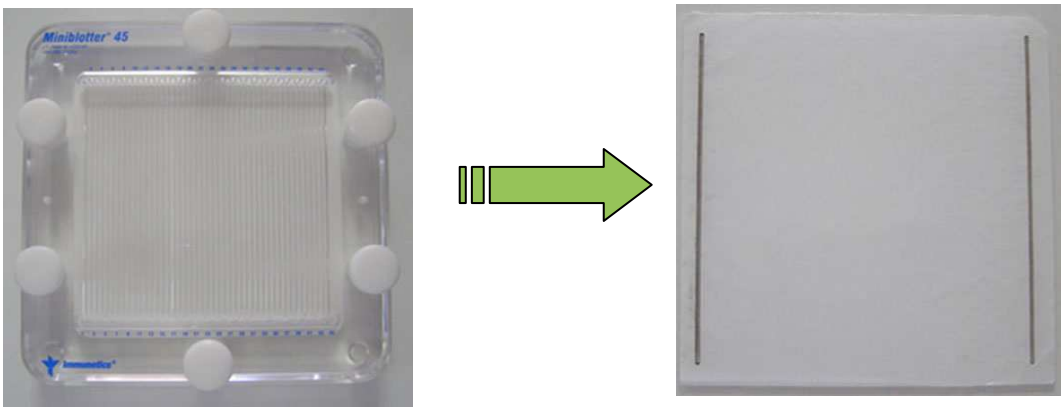


Fig. 3.3. Imagen de un *Miniblotter* y de la membrana preparada con los 43 oligonucleótidos.

<u>Primera vez que se prepara una membrana nueva</u>: Para inactivar la membrana en este caso se incuba con NaOH 100mM (0,8 g NaOH en 200 ml H_2O) en tubo de hibridación "cara arriba" a T.A. con rotación durante 9 minutos (Máximo 10 minutos). Luego se saca del tubo y se lava con 250 ml SSPE 2X-0,1% SDS (100 ml SSPE 20X + 1g SDS + 900 ml H_2O) 5 minutos a 60ºC en placa con agitación.

<u>Cuando se reutilice una membrana previamente preparada:</u> Para inactivar la membrana en este caso se incuba a 80ºC con agua destilada-1% SDS (400 ml de agua destilada + 4 g SDS) durante 30 minutos, se repite dos veces cambiando el líquido cada vez (200 ml cada vez). Posteriormente se lava con 100 ml EDTA 20mM (4 µl de la solución stock de EDTA 0,5M en 100 ml H_2O) 15 minutos a T.A. en placa con agitación. Finalmente, se guarda a 4ºC envuelta en plástico hasta su siguiente utilización.

Amplificación de las muestras:

Cebadores (*Primers*):

Los *primers* utilizados fueron:

DRa: GGTTTTGGGTCTGACGAC 5' marcado con biotina
DRb: CCGAGAGGGGACGGAAAC

Se emplearon 20pmol de cada *primer* (Solución stock 100 µM)

Reactivos de amplificación (Master MIX)

Se utilizaron reactivos *GE Healthcare Life* Sciences para PCR estándar (*Pure taq Ready-to-go PCR Beads*). Bolas unidosis que contienen: ~ 2.5 unidades de PuReTaq DNA polymerase, 10 mM Tris-HCl, (pH 9.0 a temperatura ambiente), 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM de cada dNTP, estabilizadores y BSA. A cada unidad se le debe añadir el ADN, los *primers* necesarios y agua hasta un volumen final de 25 µl.

Condiciones de la amplificación:

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo siguiendo el mismo protocolo: 20 pmoles de cada *primer* (*Thermo Fisher Scientific*), 1 dosis de *Pure taq Ready-to-go PCR Beads*, ADN (5µl del sobrenadante de cada cepa y de las muestras control*) y 12 µl de agua estéril.

*Con cada tanda de muestras deben incluirse las cepas de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG.

Programa de la amplificación:

Se utilizó un termociclador *BioRad MyCycler Thermal Cycler* con el siguiente programa:

Nº de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	96ºC	3 min
30	96ºC	1 min
	55ºC	1 min
	72ºC	0:30 min
1	72ºC	10 min
1	4ºC	∞

Tabla 3.2. Programa de amplificación de *Spoligotyping*.

Hibridación de la membrana:

Soluciones:

- SSPE 2X-0,1% SDS 500 ml **60ºC** (100 ml SSPE 20X + 1g SDS + 900 ml H_2O)
- SSPE 2X-0,5% SDS 500 ml **60ºC** (100 ml SSPE 20X + 5g SDS + 900 ml H_2O)
- SSPE 2X-0,5% SDS 500 ml **42ºC** (100 ml SSPE 20X + 5g SDS + 900 ml H_2O)
- SSPE 2X 500 ml T.A**.** (100 ml SSPE 20X + 900 ml H_2O)

Desnaturalización del ADN:

El producto de la amplificación mezclado con 150 µl de SSPE 2X-0,1% SDS se desnaturaliza en un termociclador *BioRad MyCycler Thermal Cycler* (10 minutos a 99 ºC) y se pasa a hielo bruscamente.

Hibridación:

El producto desnaturalizado (150 µl) se carga en los pocillos 2 – 44 del *Miniblotter* en el que previamente se ha colocado la membrana (dándole ¼ de vuelta respecto a la posición que tenía en la Preparación de la Membrana).

Se sellan los pocillos y se incuba durante 90 min a 60ºC en un horno de hibridación.

Se aspira el contenido de los pocillos con una bomba de aire y se lava la membrana 2 veces con 250 ml SSPE 2X-0,5% SDS 10 minutos a 60ºC.

Se coloca en un tubo de hibridación y se añade el conjugado de estreptavidina-peroxidasa (6,3 µl del conjugado POD –*Roche*- reconstituido + 25 ml SSPE 2X-0,5% SDS). Se incuba en el horno de hibridación 50 min con rotación.

Se lava dos veces con 250 ml SSPE 2X-0,5% SDS 10 minutos a 42ºC y se aclara 2 veces con 250 ml SSPE 2X a T.A.

Generación de señal:

12,5 ml del reactivo de detección nº 1 del kit ECL + 12,5 ml del reactivo de detección nº2

Esta mezcla se añade sobre la membrana en oscuridad durante 90 segundos.

Se retira el exceso de líquido y se envuelve en *film* transparente.

En total oscuridad se coloca la membrana en un

cassette y sobre ella una película autorradiográfica *Hiperfilm ECL* (10 minutos).

Revelado:

Se saca la película del *cassette* y se introduce 1 minuto y 30 segundos en líquido revelador (*Kodak*), se pasa al líquido fijador (*Kodak*) durante un mínimo de 3 minutos, y finalmente se lava durante 5 minutos y se deja secar.

Las películas se escanean y se archivan para posteriores análisis.

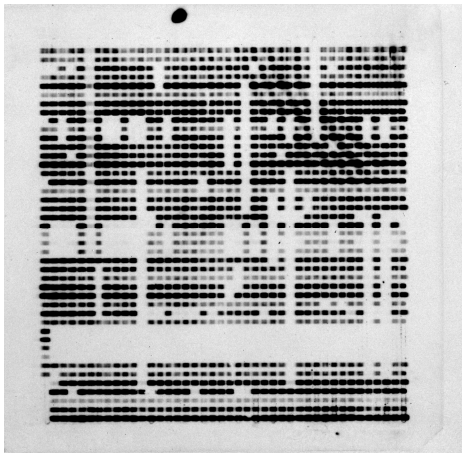


Fig. 3.4. Imagen de una película de *Spoligotyping*.

Análisis comparativo de los patrones obtenidos:

Software específico *Fingerprinting Informatix II*, versión 3.0 (*BioRad*)

Posteriormente se procedió a la codificación de los patrones obtenidos en formato binario, valor octal, y código-denominación internacional cuando lo hubiera.

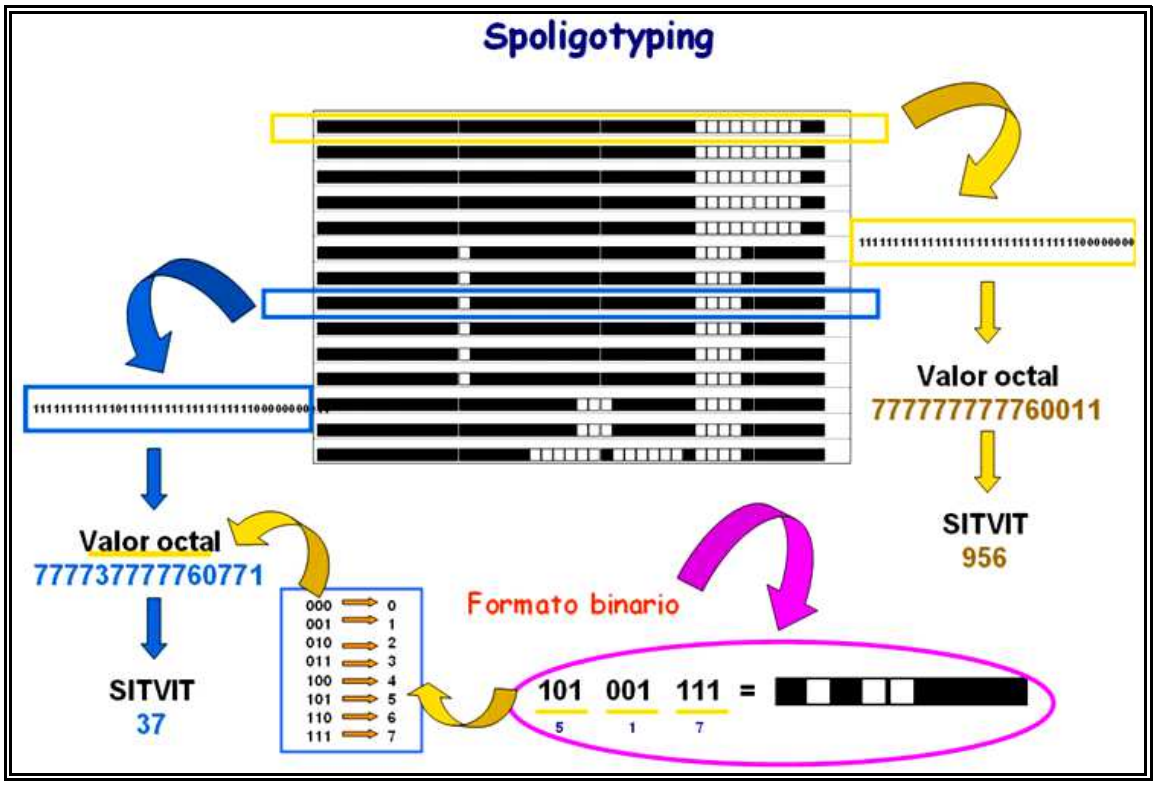


Fig. 3.5. Esquema de la traducción a distintos códigos: presencia/ausencia de espaciadores, Código binario, Código octal, SITVIT.

RFLP IS6110 (*Restriction Fragment Length Polymorphism sequence* 6110)

Se siguió el protocolo descrito por J. van Embden et al.

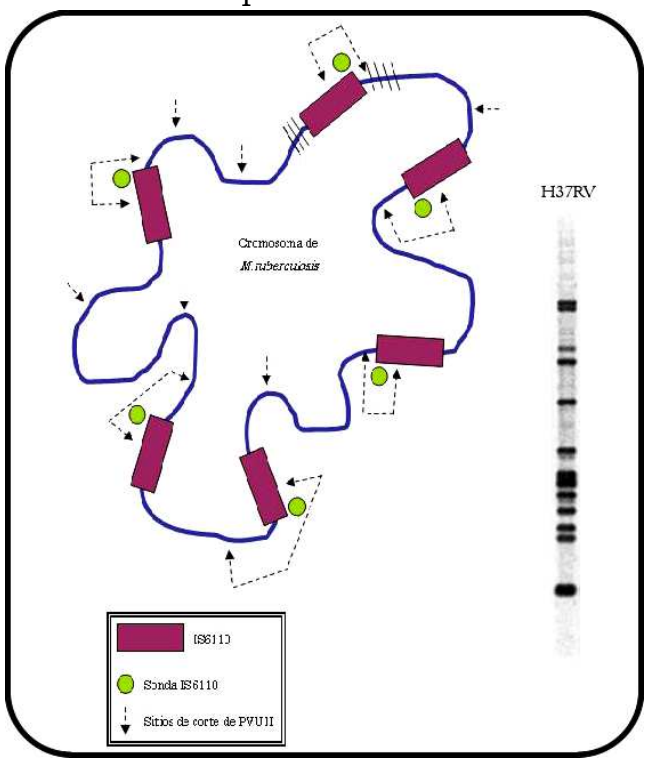


Figura 3.6.- Fundamentos RFLP-IS6110 [7]

Extracción de ADN:

Se hacen pases de las cepas problema a una placa de *middlebrook* 7H11 y se incuban a 35ºC en estufa de CO_2 hasta obtener un crecimiento adecuado.

Se recogen con un asa de plástico desechable varias asas de microorganismo (≈ 40µg) y se depositan en un tubo *eppendorf* resuspendidos en 400 µl de TE *buffer* 1x.

Se calientan a 85ºC durante 10 minutos en un baño térmico.

Se añaden 50 µl de lisozima (10mg/ml) y se incuba en baño térmico a 37ºC durante 1 hora.

Se añade una mezcla de proteinasa K (6 µl – 10mg/ml) y SDS 10% (70 µl) y se incuba 10 minutos a 65ºC.

Se vortea la mezcla una vez añadidos 100 µl de NaCl.

Se agrega 80 µl de solución CTAB-NaCl (10% N-cetyl-N,N,N-Trimethyl ammonium bromide, 0,73M NaCl (1,46 ml de NaCl 5M en 10 ml de agua destilada + 1g CTAB)) y se incuba a 65ºC durante 10 minutos.

Se añade el mismo volumen de Choroform-isoamyl alcohol y se centrifuga a 13000 rpm durante 5 minutos.

Se extrae el sobrenadante y se le añade 0,6 volumenes de 2.propanol y se deja a -20ºC durante 30 minutos.

Se vuelve a centrifugar 15 minutos a 13000 rpm y se desecha el sobrenadante. El pellet se lava con 1 ml de etanol frío al 70%.

Se centrifuga de nuevo 5 minutos a 13000 rpm y se vuelve a desechar el sobrenadante.

El pellet se deja secar a temperatura ambiente dentro de la cabina de seguridad y se resuspende en 100-150 µl de TE *buffer* 0,1x.

Digestión con *Pvu*II:

*Pvu*II tiene como secuencia diana:

Esta secuencia se encuentra dentro de la IS6110 entre las bases 460-470.

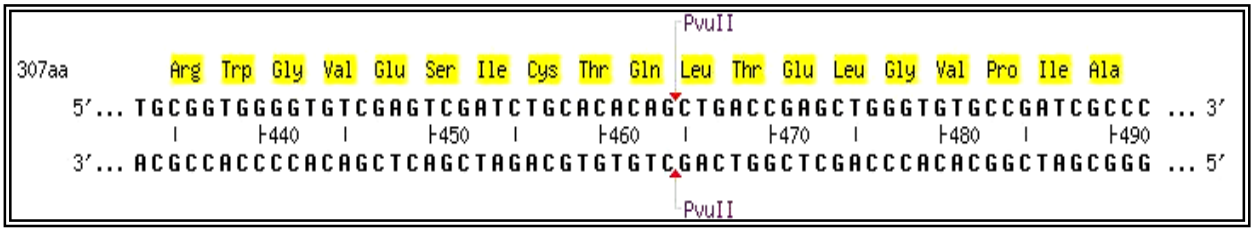


Fig. 3.7. Secuencia diana de *PvuII* dentro de la IS6110.

Se utilizaron reactivos *Promega*

Buffer B 10x		50 µl
	+	
BSA 10 µg/µl		5 µl

Preparar e identificar tantos tubos *eppendorf* con tapón de rosca como muestras a digerir y añadir a cada tubo:

2,7 µl de la mezcla anterior (*Buffer* B + BSA)

+

3,5 µl de *PvuII* (35 unidades)

+

21 µl del ADN problema

Volumen final: **27,2 µl**

Se centrifuga unos segundos y se deja incubar a 37º durante 18 horas.

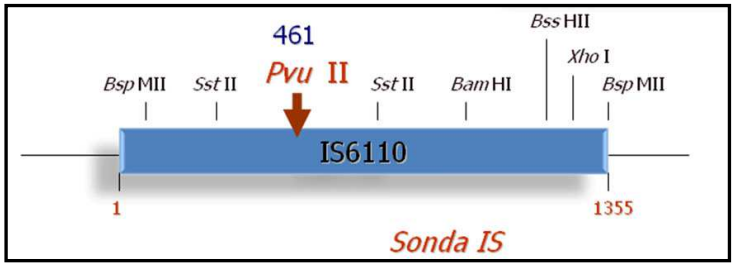


Fig. 3.8. Sitios de corte de distintos enzimas en la secuencia IS6110.

Electroforesis:

Se utiliza un gel de agarosa al 0,8 %

200 ml TBE 1x

***buffer* + 1,6gr. Agarosa + 14 µl Bromuro de Etidio (1µg/ml)**

Agarosa: *Agarose for DNA electrophoresis. SERVA*

Buffer: *Buffer TE 10x. SERVA* (180ml de agua + 20 ml TBE 10x *SERVA*)

Bromuro de Etidio ($C_{21}H_{20}BrN_3$)

En cada pocillo se cargan los 27,2 µl de muestra + 6 µl de Tampón de carga (*Blue/orange 6x PROMEGA*).

Para poder realizar una interpretación de los patrones obtenidos mediante el software *Informatix II*, tendremos que incluir unos marcadores o cepas de referencia (H37Rv, Mt14323). Para ello, 1 calle central deberá llevar un marcador interno resultado de la mezcla de 2 clases de marcadores.

3 µg "*supercoiled DNA ladder*" (6µl)+ 1 µg "φ174 RF DNA/ *HaeIII* fragments" (2µl) + 30 µl Tampón de carga

Se cargan en la calle central 4,4 µl de esta mezcla + 15,6 µl de agua

En la última calle se incluye como control la cepa 37RV.

Condiciones de la electroforesis:

La electroforesis se realizó en una cubeta *BioRad Sub-cell GT* con el suficiente volumen de *buffer* para que cubra todo el gel (aprox. 1500 ml *buffer* TE 0,5x. *SERVA*).

Se utiliza una fuente de electroforesis *BioRad Power Pac Universal* 500W. El gel se deja correr a 80V durante 10 minutos para posicionar el ADN digerido en las correspondientes calles y para "forzar" que no se salga de los pocillos.

Correr el ADN digerido a 35 voltios durante 18 horas.

Chequeo de la digestión:

En muestras problemáticas se puede hacer un chequeo de digestión antes de hacer la electroforesis.

Se mezclan en un trozo de papel *parafilm*:

6 µl de Tampón de carga por muestra + 11 µl de agua destilada + 3 µl del ADN digerido

Se carga un gel de agarosa al 0,8% con las muestras (en calles paralelas CON/SIN digerir -también 3µl-) a 120v durante 2 horas (o bien 80v 3-4 horas).

Se utilizó una fuente de electroforesis *BioRad Power Pac Universal* 500W

Debe poder verse el "efecto escalera" en las muestras digeridas correctamente y tenemos que registrar la intensidad de la señal de cada muestra para poder así calcular la cantidad de ADN digerido que debemos echar a cada pocillo en la electroforesis definitiva y obtener una mayor homogeneidad en la reacción de hibridación.

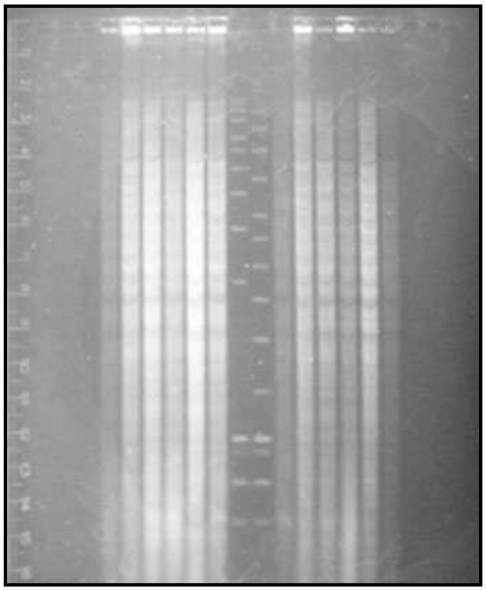


Fig. 3.9. Imagen de un gel tras la electroforesis visto con luz ultravioleta

Transferencia:

Preparación del gel:

Se expone 5 minutos a luz ultravioleta en un transiluminador (302 nm, 8000 μW/cm^2).

Se cubre con HCL 0,25 M durante 8 minutos.

Se sumerge dos veces con NaOH 0,4 M durante 10 minutos.

Preparación de la membrana:

Se humedece una membrana de *nylon* con carga (+) *Hybond-N+* con agua destilada y se deja flotando en SSX 20x durante 10 minutos.

Transferencia:

Se utilizó una cubeta de transferencia (*Vaccum Blotter Bio-Rad*) y una bomba de vacío (1,5 In. Hg ≈ 50 mbar de presión).

Solución nº 1: HCl 0,25 M durante 7 minutos cubriendo el gel.

Solución nº 2: NaCl 1,5 M + NaOH 0,5 M + agua destilada durante 7 minutos cubriendo el gel.

Solución nº 3: Tris 1M + NaCl 1,5 M + agua destilada, ph 7,5 ajustado con HCl, durante 7 minutos cubriendo el gel.

Solución nº 4: SSC 20x + agua destilada, ph 7 ajustado con HCl, inundándo toda la cubeta y durante 3 horas.

La membrana se aclara con agua destilada y se fija el ADN por el anverso 2,5 minutos en el transiluminador.

Hibridación:

Se llevó a cab con el kit ECL *Direct nucleic acid labelling and detection system*.

Fabricación de la sonda:

La sonda IS6110 se prepara por PCR obteniendo un fragmento de 245 bp.

Se utilizaron reactivos *GE Healthcare Life Sciences* para PCR estándar (*Pure Taq Ready-to-go PCR Beads*) que llevan todos los ingredientes necesarios para la reacción de amplificación excepto los *primers* y el ADN problema. Se siguen las indicaciones del fabricante: Volumen final 25 µl.

Deberemos disponer de los siguientes *primers* (*Thermo Fisher Scientific*):

Primer INS-1 5'CGTGAGGGCATCGAGGTGGC-3' 2,5 pmol

Primer INS-2 5'GCGTAGGCGTCGGTGACAAA-3' 2,5 pmol

A cada vial de amplificación le corresponderán:

1µl del *primer* INS-1 + 1 µl del *primer* INS-2 + 18 µl de agua destilada

Se añaden **5 µl de ADN** de *Mycobaterium bovis* BCG diluido 1/10 con agua destilada.

Programa de la amplificación:

Se utilizó un termociclador *BioRad MyCycler Thermal Cycler* con el siguiente programa:

Nº de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94ºC	3 min
20	94ºC	1 min
	65ºC	1 min
	72ºC	2 min
1	72ºC	4 min
1	4ºC	∞

Tabla 3.3. Programa de amplificación de la sonda para RFLP-IS6110.

Electroforesis:

Se utiliza un gel de agarosa al 2% dejando que corra 1 hora a 120 voltios.

Utilizar como marcadores de peso molecular los *PCR markers* (bandas de 1000, 750, 300, 150, 50 bp).

Se obtiene una banda de 245 bp.

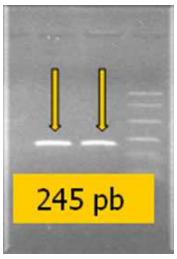


Fig. 3.10. Imagen de la electroforesis realizada para comprobar la presencia de la banda de 245pb correspondiente a la sonda.

Purificación:

Se utilizó el kit "*ProbeQuant G-50 Micro Columns*".

Se prepara la columna vorteando para resuspender la resina y centrifugando durante 1 minuto a 735 *g* (3000 rpm).

Se introducen 50 µl de muestra y se centrifuga durante 2 minutos a 735 *g* (3000 rpm).

En el eppendorf situado debajo de la columna se recoge el ADN purificado.

Precipitar añadiendo 2,5 volumenes de etanol y manteniendo a -20ºC durante 30 minutos.

Centrifugar a 12000 *g* durante 15 minutos.

Lavar el *pellet* añadiendo 1 ml de etanol 70% y volver a centrifugar a 12000 *g* 5 minutos.

Secar el *pellet* al aire y resuspender en 50 µl de agua destilada.

Cuantificación:

Se cuantifica en un espectrofotómetro (*Gene Spec I. Naka Instruments*) (OD_{260})

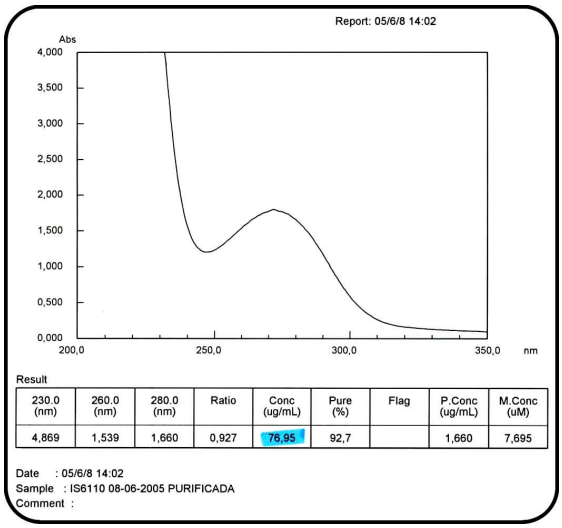


Fig. 3.11. Lectura en el espectrofotómetro de la sonda.

Marcaje de la sonda:

Se utilizó el kit: *"ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System".*

Sonda IS6110: Se necesitan 10 ng de sonda marcada /ml *buffer* de hibridación. Diluir la sonda IS6110 que va a ser marcada hasta un volumen final de 50 µl. La concentración de sonda que va a ser marcada deberá ser del orden de 20-40 ng/ µl.

Marcadores: Se mezclan 6 µl de *supercoiled* DNA ladder diluido 25 ng/µl [10µl supercoiled + 90 µl de TE 0,1x] + 2 µl de ϕx174 RF DNA/*Hae*III fragments diluido [10µl ϕx174 + 90 µl de TE 0,1x]. Diluir hasta un volumen final de 50 µl.

Se desnaturaliza en baño el ADN durante 5 minutos en agua hirviendo.

Se pasa a hielo para enfriar de forma brusca y se mantiene 5 minutos.

Se centrifuga y se añaden 50 µl del reactivo marcador.

Se añaden 50 µl de glutaraldehído.

Se deja incubando en un baño a 37ºC durante 10 minutos.

Preparación del *buffer* de hibridación:

Se coge el volumen de *buffer (Gold hybridization buffer)* necesario (se recomienda un volumen de 0,125 ml / cm^2.

Se añade NaCl para conseguir una concentración óptima 0,5 M.

Se añade el agente bloqueante a una concentración final del 5% (w/v).

Se mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora en un agitador magnético.

Se calienta a 42ºC durante 30-60 minutos con mezclado ocasional.

50 ml de *buffer* + 1,45 g de NaCl + 2,5 g agente bloqueante

Prehibridación:

La membrana humedecida se introduce en el tubo de hibridación (35 mm de diámetro) y se añaden 25 ml del *buffer* de hibridación.

En el tubo opuesto se calientan otros 25 ml de *buffer* de hibridación.

Se mantienen a 42ºC a 4 rpm durante un mínimo de 15 minutos.

Se desecha el *buffer* de hibridación del tubo con la membrana.

Hibridación:

Se mezclan los 25 ml de *buffer* precalentado a 42ºC con la sonda marcada y los marcadores.

Se vierte la mezcla en el tubo con la membrana y se mantiene a 42ºC y 6 rpm durante toda la noche.

Lavado:

Se desecha el *buffer* de hibridación

Se hacen dos lavados con SSPE 2X-0,5% SDS. 10 minutos a 42ºC.

Otros dos lavados con 250 ml SSPE 2X. 5 minutos a Temperatura ambiente.

Generación de señal:

12,5 ml del reactivo de detección nº 1 del kit ECL + 12,5 ml del reactivo de detección nº2

Esta mezcla se añade sobre la membrana en oscuridad durante 1 minuto.

Se retira el exceso de líquido y se envuelve en *film* transparente.

En total oscuridad se coloca la membrana en un *cassette* y sobre ella una película autorradiográfica *Hiperfilm ECL* (10 minutos).

Revelado:

El tiempo de exposición en esta técnica depende mucho de la cantidad de ADN conseguida para cada muestra. Se obtendrá más señal cuanto más ADN contenga la membrana.

Se saca la película del *cassette* y se introduce 1 minuto y 30 segundos en líquido revelador (*Kodak*), se pasa al líquido fijador (*Kodak*) durante un mínimo de 3 minutos, y finalmente se lava durante 5 minutos y se deja secar.

Las películas se escanean y se archivan para posteriores análisis.

Análisis comparativo de los patrones obtenidos:

Software específico *Fingerprinting Informatix II*, versión 3.0 (*BioRad*)

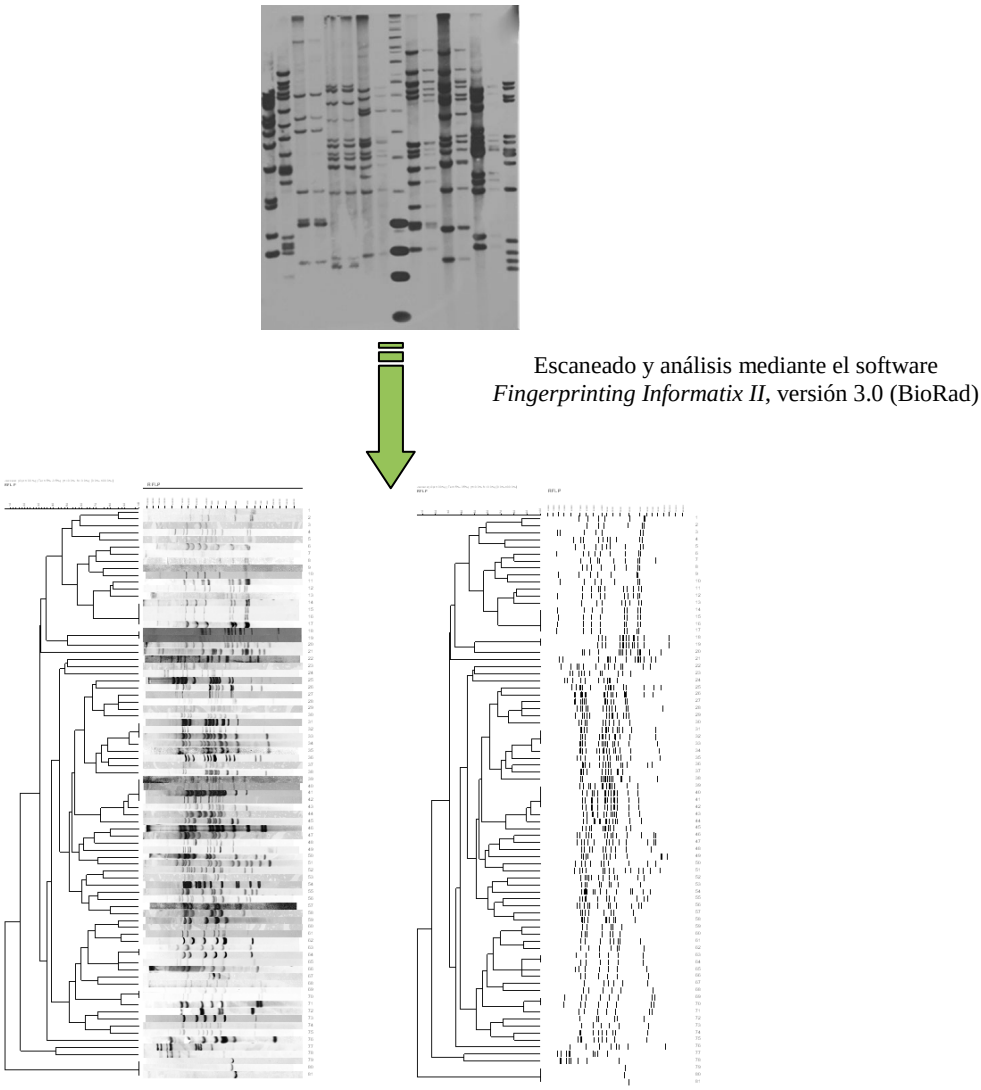


Fig. 3.12 Película de RFLP-IS6110 y posterior análisis con software *Fingerprinting Informatix II*, versión 3.0 (*BioRad).*

Resultados

Datos demográficos de los casos de tuberculosis, Asturias 2004 – 2010

Durante el periodo junio 2004 - diciembre 2010 en el Principado de Asturias se registraron 1255 casos de tuberculosis con confirmación microbiológica (agente causal *Mycobacterium tuberculosis* complex, se han excluido las cepas de *M. bovis* BCG aisladas en orina en el contexto de instilaciones vesicales). Del total de casos 885 correspondían a hombres (70,5%) y 370 a mujeres (29,5%). En la Tabla 4.1 se desglosan los datos por años, con una media en Asturias durante el periodo objeto de estudio de unos 195 casos por año, lo que se corresponde con una Tasa de Incidencia de tuberculosis en el Principado de Asturias que oscila entre los 16,9-19,9 casos/100.000 habitantes.

Año	Mujeres	Hombres	Total	Incidencia	Población
junio-dic 2004	23	60	83	-	1.073.761
2005	66	132	198	18,3	1.076.635
2006	65	150	215	19,9	1.076.896
2007	48	134	182	16,9	1.074.862
2008	54	146	200	18,5	1.080.138
2009	51	136	187	17,2	1.085.289
2010	63	127	190	17,5	1.084.341
Total	370	885	1255	18,05	

Tabla 4.1. Número anual de casos por sexos durante el periodo junio 2004 - diciembre 2010 y Tasa de Incidencia en Asturias (INE, fuente para datos censo de población)

La distribución por rango de edad se presenta en la Tabla 4.2 en la que se constata que el mayor número de casos se producen en los tramos de 75-84 años (218 casos) y de 25-34 años (208 casos) respectivamente, conformando la típica curva de distribución bimodal (Figura 4.1).

	2004 Jun-Dic		2005		2006		2007		2008		2009		2010		Total %	
Edad	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer		
0-14	-	1	-	1	2	2	2	1	2	-	-	2	2	1	16	1,3
15-24	4	3	8	8	4	3	8	6	10	7	4	8	7	5	85	6,8
25-34	8	8	15	10	20	21	22	9	19	8	23	12	22	11	208	16,6
35-44	5	2	27	10	22	10	26	10	26	11	23	4	14	12	202	16,1
45-54	9	4	16	6	23	6	19	5	17	7	20	5	29	6	172	13,7
55-64	6	-	15	7	15	6	12	7	24	3	18	2	13	3	131	10,4
65-74	12	2	19	10	29	6	18	6	14	9	16	7	16	7	171	13,6
75-84	15	2	29	9	31	6	20	4	31	8	23	8	18	14	218	17,4
>85	1	1	3	5	4	5	7	-	3	1	9	3	6	4	52	4,1
Total	60	23	132	66	150	65	134	48	146	54	136	51	127	63	1255	

Tabla 4.2. Distribución de casos por rango de edad, periodo junio 2004- diciembre2010

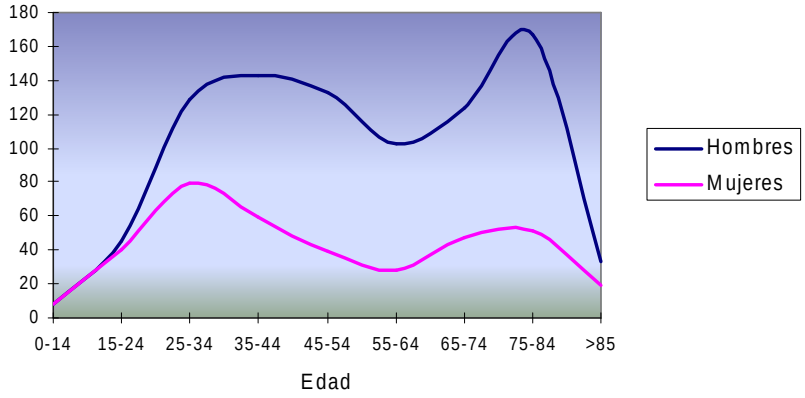


Fig. 4.1. Distribución casos de tuberculosis por sexo y edad

En cuanto a la distribución por sexo y edad, la mayor diferencia en la proporción de casos entre hombres y mujeres se produjo en el rango de edad comprendido entre 55-64 años, registrándose una proporción de 3,67 casos en hombres por cada caso en mujeres. La proporción hombre/mujer 3/1, reconocida en la literatura como habitual, solamente se constató en los rangos de edad comprendidos entre 45 y 84 años. Sin embargo, en la población más joven, intervalo de edad de 0-34 años, la diferencias hombre/mujer se redujeron considerablemente (situándose la proporción en 1,43). Es destacable que evidenciamos una equiparación, prácticamente total, en menores de 24 años (proporción de 1,1). En la Tabla 4.3 se muestra más en detalle.

Edad	Hombres	Mujeres	Proporción Hombre/mujer
0 – 14	8	8	1
15 – 24	45	40	1,12
25 – 34	129	79	1,63
35 – 44	143	59	2,42
45 – 54	133	39	3,41
55 – 64	103	28	3,67
65 – 74	124	47	2,63
75 – 84	167	51	3,27
>85	33	19	1,73

1,43

3,12

Tabla 4.3. Distribución de casos por sexo y rango de edad, proporción de casos hombre/mujer

Distribución de casos por Área Sanitaria

Las áreas sanitarias con mayor índice de población (III, IV y V) fueron las que presentaron el mayor número de casos (975 casos, 77,6% del total), entre ellas destaca el área IV donde se registraron 469 casos (37,3% del total). En la Tabla 4.4 se muestra la distribución de casos por Área sanitaria y por año.

Área Sanitaria	**2004 Jun-dic**	**2005**	**2006**	**2007**	**2008**	**2009**	**2010**	**Total**
I	0	6	6	2	11	5	3	33
II	2	3	6	5	10	5	4	35
III	10	27	34	32	30	30	22	185
IV	32	69	76	71	86	64	71	469
V	11	58	64	39	37	49	63	321
VI	3	2	5	3	3	2	3	21
VII	15	18	10	17	7	14	8	89
VIII	10	15	14	13	16	18	16	102
Total	83	198	215	182	200	187	190	1255

Tabla 4.4. Distribución de casos en el Principado de Asturias por Área Sanitaria, periodo junio 2004–diciembre 2010

En la Figura 4.2 se muestran las tasas de incidencia correspondientes a cada área sanitaria, cabe reseñar que las áreas IV, VII y VIII presentan las mayores tasas de incidencia (20,1; 17,8; y 17,7/100.000 respectivamente), y que las áreas I y VI presentan las más bajas (5,6 y 9,2/100.000 respectivamente).

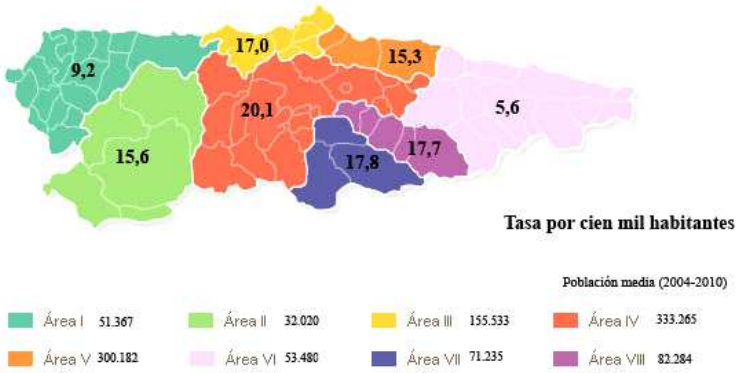


Fig 4.2. Tasas de Incidencia en Asturias, desglosado por Áreas sanitarias.

En la Unidad de Referencia Regional de Micobacterias del HUCA se recibieron la totalidad de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* complex aisladas en los laboratorios de Microbiología del SESPA durante el periodo objeto de estudio; cada laboratorio procesó las muestras clínicas de los pacientes atendidos en su hospital.

Origen de las muestras a partir de las cuales se aisló M. *tuberculosis* complex

Los tipos de muestra se desglosan en la Tabla 4.5.

Origen de la muestra		Número
Respiratorias	Aspirado bronquial	55
	Biopsia Pulmonar	13
	Esputo	900
	Lavado broncoalveolar	23
Extra-respiratorias	Biopsia colon	2
	Biopsia cuerda vocal	1
	Biopsia disco intervertebral	1
	Biopsia endometrio	1
	Biopsia epidídimo	1
	Biopsia faringe	1
	Biopsia ganglionar	45
	Biopsia nódulo	3
	Biopsia ósea	2
	Biopsia pericardio	1
	Biopsia pleural	16
	Exudado purulento	18
	Heces	2
	Jugo gástrico	10
	Líquido ascítico	8
	Líquido cefalorraquídeo	2
	Líquido pericárdico	6
	Líquido pleural	68
	Líquido sinovial	4
	Orina	31
	PAAF ganglio/nódulo/disco	20
Origen no especificado	Cepas	21

Tabla 4.5. Origen de las 1255 muestras clínicas en las que se aisló e identificó *Mycobacterium tuberculosis* complex

Especies incluidas en el taxón *Mycobacterium tuberculosis* complex identificadas en Asturias

Como era de esperar, *M. tuberculosis* subespecie hominis fue la especie identificada con mayor frecuencia siendo responsable de 1233 casos (98,2%). En la Tabla 4.6 se muestran las especies circulantes en nuestra región. Durante el periodo objeto de estudio no se identificó ninguna cepa del resto de especies que componen el complejo tuberculoso: *M. canetti, M. pinnipedi, M. caprae y M. microti.*

Especie	Número de cepas
M. tuberculosis subespecie hominis	1233
M. bovis subespecie bovis	16
M. africanum tipo 1	4
M. bovis BCG*	2

*origen exudado purulento, se excluyeron todos los aislamientos de esta especie en orina.

Tabla 4.6. Especies incluidas en el taxón *M. tuberculosis* complex identificadas en Asturias.

Resultados de las pruebas de sensibilidad

Se pudo realizar el antibiograma a 1252 de las 1255 cepas (99,7%); en 2 cepas no fue posible por ausencia de crecimiento y en 1 cepa por tratarse de un cultivo mixto con dos especies de micobacterias creciendo a la vez, lo que hizo imposible individualizar los resultados del antibiograma. Del total de cepas, 1178 (94,1%) no presentaban resistencia a ninguna droga de primera línea, y 74 (5,9%) presentaban alguna resistencia (primaria + secundaria) a drogas de primera línea. Los resultados desglosados se muestran en la Tabla 4.7.

Antibiograma		Número de cepas	%
Resistencia	Rifampicina	7	0,5
	Isoniacida	39	3,1
	Etambutol	5	0,4
	Estreptomicina	19	1,5
	Pirazinamida	24	1,9
Multirresistentes (MDR-TB)		7	0,5
Extremadamente resistentes (XDR-TB)		1	0,08
Polirresistencias		9	0,7

Tabla 4.7. Situación de las resistencias de *M. tuberculosis* complex a drogas de primera línea en Asturias, periodo 2004-2010.

Spoligotyping

Se completó la identificación mediante esta técnica en 1244 cepas de las 1255 incluidas en el estudio, lo supone el 99,1% del total. En 11 cepas (0,9%) la identificación no fue posible porque, o bien la cepa recibida no era viable, o había sido remitida en condiciones inadecuadas.

Se identificaron un total de 281 patrones (*spoligotypes*) diferentes, lo que permite constatar una gran diversidad de genotipos de *M. tuberculosis* "circulantes" en Asturias. En la mayoría de las ocasiones los patrones estaban compartidos por más de una cepa, se identificaron 111 *clusters* -o agrupamientos- que englobaban a un total de 1074 cepas lo que supone que en Asturias la tasa de agrupamiento detectada mediante S*poligotyping* durante el periodo 2004-2010 fue del 86,3%. Los *clusters* eran muy heterogéneos en cuanto al número de cepas que formaban parte de ellos, cubrían un rango que iba desde los *clusters* más frecuentes, los que estaban integrados por 2 cepas idénticas (había 42 *clusters* de este tipo los cuales, a su vez, eran diferentes entre sí), hasta el *cluster* más numeroso que estaba formado por 109 cepas genéticamente idénticas. Asimismo, se identificaron 170 cepas con patrones huérfanos -o únicos- lo que representaba el 13,6% del total. En la Tabla 4.8 se muestran todos los *clusters* identificados desglosados de acuerdo a la composición en cuanto al número de cepas integrantes.

Nº de *clusters*	Nº de cepas	%
42	2	37,8
22	3	19,8
6	4	5,4
9	5	8,1
4	6	4,5
4	7	2,7
2	8	1,8
2	9	1,8
2	10	1,8
2	11	1,8
2	12	1,8
1	13	0,9
1	14	0,9
1	15	0,9
1	16	0,9
2	21	1,8
1	35	0,9
1	42	0,9
1	61	0,9
2	85	1,8
1	86	0,9
1	100	0,9
1	109	0,9

Tabla 4.8. *Clusters* de cepas de *M. tuberculosis* identificados en Asturias durante el periodo 2004-2010.

Patrones de *Spoligotyping* identificados en Asturias

Spoligotyping	Valor octal	Nº de cepas
	777777607760771	109
	777777777760771	100
	776177607760771	86
	777777557760771	85
	777777777720771	85
	776160000000071	61
	777777774020771	42
	775017607760771	35
	776177400000171	21
	777777777660771	21
	677777607760771	16
	677777607660771	15
	000000004020771	14
	777737557760771	13
	720077607760771	12
	777777607560771	12
	777737607760771	11
	777737777760771	11
	000000007760771	10
	776037777660771	10
	037577777760771	9
	777777477400001	9
	337777777760771	8
	777777577760771	8
	776376003760771	7
	777777457760771	7
	777777777720731	7
	777777777760731	7
	757777777760771	6
	776337773740731	6
	777776777760771	6
	777777377720771	6
	377700777720771	5
	676573777777600	5
	677737607760731	5
	700076777760771	5
	776377777760771	5
	777677607760771	5
	777703777760771	5
	777777774020731	5
	777777777760011	5
	000000000003771	4
	577737557741771	4
	677677607760771	4
	777777677760771	4

[redacted]	777777774020711	4
[redacted]	777777777760071	4
[redacted]	076177400000171	3
[redacted]	577777607760771	3
[redacted]	676773677777600	3
[redacted]	677737607760771	3
[redacted]	677777607760471	3
[redacted]	677777777720771	3
[redacted]	703777740003771	3
[redacted]	734137600020771	3
[redacted]	736174607760771	3
[redacted]	756177607760771	3
[redacted]	776163400000171	3
[redacted]	776177607760751	3
[redacted]	776377607760771	3
[redacted]	777730607760771	3
[redacted]	777757777760771	3
[redacted]	777776770000000	3
[redacted]	777777207760771	3
[redacted]	777777604360731	3
[redacted]	777777647760771	3
[redacted]	777777747760771	3
[redacted]	777777757760771	3
[redacted]	777777776000000	3
[redacted]	000177777760771	2
[redacted]	057775777760771	2
[redacted]	077777607760771	2
[redacted]	376177607760771	2
[redacted]	417176777760731	2
[redacted]	575777777740771	2
[redacted]	577777777760771	2
[redacted]	600377774020771	2
[redacted]	616773777777600	2
[redacted]	617777607760771	2
[redacted]	617777777720771	2
[redacted]	676340337760771	2
[redacted]	676773777777600	2
[redacted]	677777607760000	2
[redacted]	677777777710771	2
[redacted]	737777777760771	2
[redacted]	757775777760771	2
[redacted]	757777607760771	2
[redacted]	757777774020771	2
[redacted]	770037777760721	2
[redacted]	774177400000171	2
[redacted]	775777766660771	2
[redacted]	776337777760771	2

	777177607760771	2
	777736770000000	2
	777737607560771	2
	777776777760601	2
	777777477720771	2
	777777557760731	2
	777777577720771	2
	777777600760771	2
	777777607760770	2
	777777657760771	2
	777777743760771	2
	777777744020771	2
	777777770020771	2
	777777775720771	2
	777777777520771	2
	777777777560771	2
	777777777700071	2
	777777777700771	2
	777777777760700	2
	777777777760751	2
	000000000000031	1
	000000000000331	1
	000000000003771	1
	000000006360731	1
	000000007720771	1
	000000007760731	1
	017625606640751	1
	376017607760771	1
	377737607560771	1
	377777777720771	1
	377777777760751	1
	377777777760771	1
	416177607760771	1
	436773676777600	1
	437777607760771	1
	477377777760731	1
	477777277403771	1
	477777777760771	1
	504002347760471	1
	577765657745771	1
	577767477760771	1
	577767607540771	1
	577777737760771	1
	577777777760700	1
	600000007720771	1
	607736770000000	1
	617777774020771	1

[redacted]	636573777777600	1
[redacted]	637777777760771	1
[redacted]	657737607760731	1
[redacted]	664063777747600	1
[redacted]	666773677777600	1
[redacted]	676377737760771	1
[redacted]	676573777737600	1
[redacted]	676773777477600	1
[redacted]	676777607760771	1
[redacted]	677607774020771	1
[redacted]	677777557760771	1
[redacted]	677777607640771	1
[redacted]	677777607760711	1
[redacted]	677777776000371	1
[redacted]	700076377760771	1
[redacted]	703777400003771	1
[redacted]	717777577760771	1
[redacted]	720077606760771	1
[redacted]	737777607760700	1
[redacted]	737777761760771	1
[redacted]	737777774020771	1
[redacted]	737777777040771	1
[redacted]	737777777720771	1
[redacted]	740000377760731	1
[redacted]	740037777720771	1
[redacted]	757400004020771	1
[redacted]	777737777760771	1
[redacted]	757767607760571	1
[redacted]	760001400000171	1
[redacted]	760377777660771	1
[redacted]	760777777740331	1
[redacted]	761777743760731	1
[redacted]	761777747760771	1
[redacted]	766177400000171	1
[redacted]	767677777760771	1
[redacted]	767777777760771	1
[redacted]	770000777620731	1
[redacted]	770023777750771	1
[redacted]	770757777777671	1
[redacted]	770777707777771	1
[redacted]	770777777777671	1
[redacted]	771776777760771	1
[redacted]	773737557760771	1
[redacted]	774037000020700	1
[redacted]	774037777760700	1
[redacted]	774077606767071	1
[redacted]	774177400000171	1

[redacted]	775777757760771	1
[redacted]	776017607160771	1
[redacted]	776017607760731	1
[redacted]	776077600000171	1
[redacted]	776140007760751	1
[redacted]	776160000000171	1
[redacted]	776160000600171	1
[redacted]	776167400000171	1
[redacted]	776167607760771	1
[redacted]	776177400000771	1
[redacted]	776177605760751	1
[redacted]	776237777760771	1
[redacted]	776337777740771	1
[redacted]	776374007760771	1
[redacted]	776377770000000	1
[redacted]	776377777420771	1
[redacted]	776377777720371	1
[redacted]	777017607760771	1
[redacted]	777165602640171	1
[redacted]	777377774020771	1
[redacted]	777377777760700	1
[redacted]	777400017660731	1
[redacted]	777417777760771	1
[redacted]	777577607760771	1
[redacted]	777577700000000	1
[redacted]	777617777720771	1
[redacted]	777677374020731	1
[redacted]	777703600000771	1
[redacted]	777703600020771	1
[redacted]	777703717760771	1
[redacted]	777717770000000	1
[redacted]	777717777700000	1
[redacted]	777737607740771	1
[redacted]	777737774020771	1
[redacted]	777737777720771	1
[redacted]	777737777740011	1
[redacted]	777737777760731	1
[redacted]	777740377760771	1
[redacted]	777760774020771	1
[redacted]	777765777760771	1
[redacted]	777767607560771	1
[redacted]	777767607760771	1
[redacted]	777767657760771	1
[redacted]	777767777660771	1
[redacted]	777767777700171	1
[redacted]	777771777760771	1
[redacted]	777773777760771	1

	777774077020771	1
	777776377760771	1
	777777004020771	1
	777777037760771	1
	777777417700131	1
	777777477600071	1
	777777477720731	1
	777777601560771	1
	777777605760471	1
	777777605760571	1
	777777605760771	1
	777777606000031	1
	777777606760771	1
	777777607000771	1
	777777607400000	1
	777777607560371	1
	777777607660771	1
	777777607700771	1
	777777607720771	1
	777777607740071	1
	777777607760700	1
	777777607760731	1
	777777670760731	1
	777777677720771	1
	777777700020771	1
	777777701760771	1
	777777704020771	1
	777777707760771	1
	777777747720751	1
	777777757720771	1
	777777760000031	1
	777777760060371	1
	777777767760771	1
	777777770000171	1
	777777770760731	1
	777777774020571	1
	777777777360771	1
	777777777420731	1
	777777777420771	1
	777777777560731	1
	777777777700011	1
	777777777700331	1
	777777777720730	1
	777777777740771	1
	777777777760031	1
	777777777760471	1
	777777777760571	1

Tabla 4.9. Patrones genéticos obtenidos por *Spoligotyping* de las cepas de *M.tuberculosis* aisladas en Asturias durante el periodo 2004 – 2010, código octal y número de cepas que compartían cada genotipo.

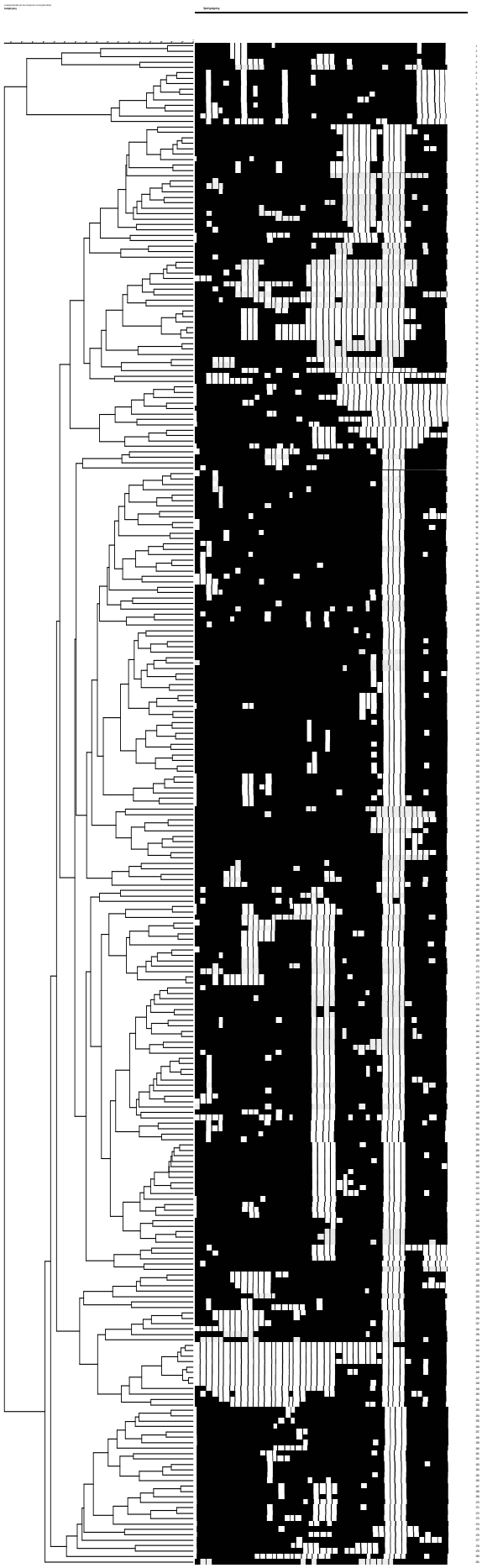


Fig. 4.3. Comparación de los 281 patrones por *Spoligotyping* identificados en Asturias

Distribución de los *clusters* por áreas sanitarias

Del total de 111 *clusters*, 31 (28%) estaban formados por cepas aisladas exclusivamente en un área sanitaria determinada, mientras que 80 (72%) incluían cepas aisladas en dos o más áreas sanitarias del Principado de Asturias (*clusters* mixtos). El Área VI y el Área II presentaban las tasas de agrupamiento más bajas (31,2 y 56,5% respectivamente); mientras que el Área IV registraba la tasa de agrupamiento más alta (75%). En la Tabla 4.10 se muestran estos datos desglosados por áreas sanitarias.

Área	Tasa de Agrupamiento %
I	60,7
II	56,6
III	69,5
IV	75
V	69,8
VI	31,2
VII	67,8
VIII	66,2

Tabla 4.10. Tasa de agrupamiento, detectada por *Spoligotyping* en Asturias periodo 2004-2010, por área sanitaria.

Entre los 42 *clusters* formados por 2 cepas, había 17 de ellos que estaban formados por cepas aisladas exclusivamente en un Área sanitaria determinada, y otros 25 que eran mixtos.

Algo similar ocurría con los 22 *clusters* formados por 3 cepas, había 11 que estaban formados por cepas aisladas exclusivamente en un Área sanitaria determinada, y otros 11 que eran mixtos.

En cuanto a los 6 *clusters* formados por 4 cepas, solamente había uno que era exclusivo de un Área (Área IV), el resto eran mixtos.

Finalmente, entre los 9 *clusters* formados por 5 cepas, había dos que eran exclusivos de un Área (Área IV), el resto eran mixtos.

Todos los *clusters* con más de 5 cepas eran mixtos.

Familias de genotipos identificadas en Asturias que están presentes en las bases de datos internacionales

Un 28% del total de cepas identificadas en Asturias (349 cepas) tienen patrones genéticos que aparecen recogidos en la base de datos internacional SPOLDB4 dentro de las denominadas familias de genotipos con más amplia distribución a nivel mundial. En la Tabla 4.11 se muestran más en detalle.

Nº de cepas en la base de datos SPOLDB 4	Familia	Nº de cepas en Asturias	Patrón *Spoligotyping*	Código Octal
6412	T1	100		777777777760771
4051	Beijing	4		000000000003771
2770	Bov 2	0		664073777777600
2410	Bov 1	2		676773777777600
1930	Lam09	109		777777607760771
1236	H1	42		777777774020771
1203	H3	85		777777777640771
1076	CAS-1 Delhi	0		703777740003771
1069	X2	2		777776777760601
1014	EAI-5	0		477777777413431
956	X1	5		777776777760771

T1= Tuscany (Rusia/2); Bov = bovis; Lam = Latin American-Mediterranean; H = Haarlem; CAS-1 Delhi = Central-Asian (Delhi); EAI = East African-Indian.

Tabla 4.11. Familias de genotipos con más amplia distribución a nivel mundial (base de datos SOLDB4, Instituto Pasteur-Guadeloupe) y su impacto en Asturias.

Además de las familias de amplia distribución mundial citadas anteriormente, en Asturias también pudimos identificar algunos *clusters* que aglutinan a un número elevado de cepas; son cepas con patrones genéticos prevalentes en nuestra Comunidad Autónoma pero que tienen una escasa representación en las bases de datos internacionales, entre ellas:

LAM 3: Esta familia es una de las más prevalentes en Asturias, en nuestro estudio representa el tercer *cluster* con mayor número de cepas, 86 en total. En la base de datos SPOLDB4 hay registradas 609 cepas con este patrón (SIT 33), 23 de ellas proceden de diferentes lugares de España.

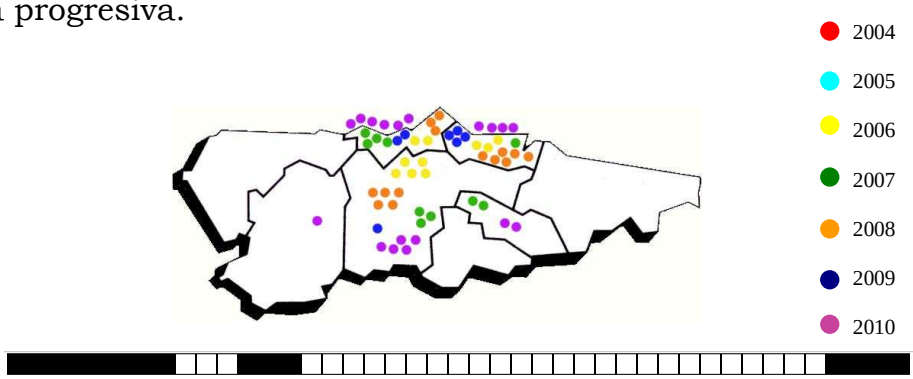
SIT 58: En Asturias 85 cepas tienen este patrón. En SPOLDB4 aparecen registradas 76 cepas en todo el mundo, 15 de ellas en España. (Conocida como Madrid-2) [41].

SIT 105: En Asturias 61 cepas tienen este patrón. En SPOLDB4 aparecen registradas 17 cepas en todo el mundo, 3 de ellas en España. (Al no tener establecido un nombre, le asignamos Asturcón-1)

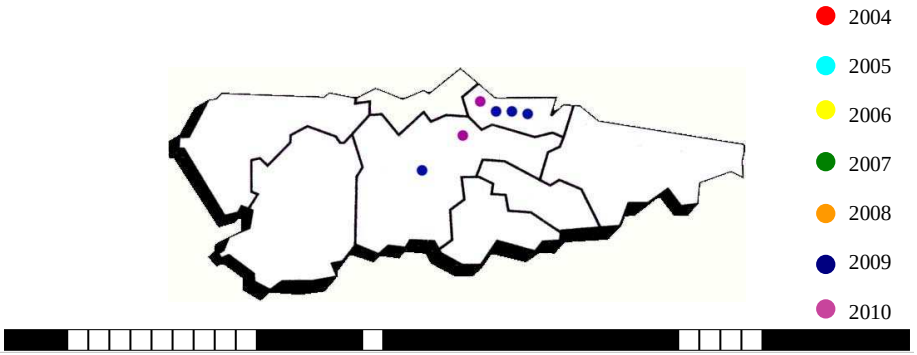
SIT 209: En Asturias 35 cepas tienen este patrón. En SPOLDB4 aparecen registradas 25 cepas en todo el mundo, 10 de ellas en España. (Conocida como Madrid – 1) [41].

Evolución en el tiempo de los patrones genéticos identificados por *Spoligotyping*

A lo largo del periodo de estudio pudimos constatar que existían patrones emergentes, que los primeros años no aparecían representados y que, una vez producida su irrupción, se expandían de manera progresiva.



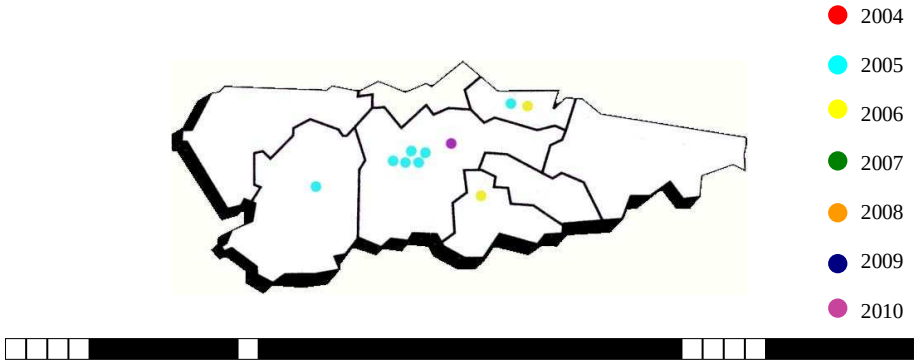
Valor octal: 776160000000071 – SITVIT: 105



Valor octal: 700076777760771 – SITVIT: 92

Fig. 4.4. Ejemplos de cepas emergentes

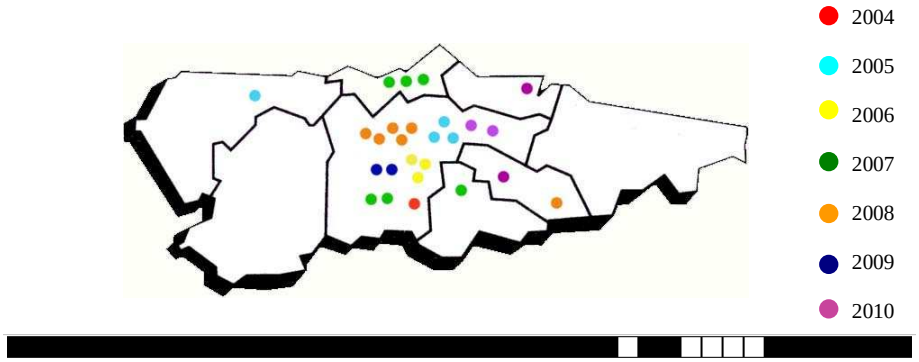
También se pudo evidenciar que con algunas cepas no ocurría lo mismo, una irrupción más o menos brusca a partir de un momento dado, no iba seguida de una expansión progresiva, pudiendo incluso constatar un retroceso paulatino.



Valor octal: 037677777760771 – SITVIT: 1278

Fig. 4.5. Ejemplo de cepa en retroceso

Asimismo, había patrones prevalentes en los cuales el número de cepas aumentaba y disminuía de manera alterna sin definirse claramente una tendencia.



Valor octal: 777777777660771 – SITVIT: 167

Fig. 4.6. Ejemplo de cepa prevalente

Para el cálculo de las tasas de agrupamiento desglosadas por sexo, edad, origen de la muestra, y baciloscopia; así como para valorar la distribución de los patrones huérfanos por rango de edad, se acotó el tramo intermedio de nuestro estudio (años 2006-2007-2008). No se tuvieron en cuenta para estos cálculos las cepas aisladas durante los dos primeros años del estudio (2004-2005) ni en los dos últimos (2009-2010). Los datos que se presentan a continuación corresponden por tanto a las cepas aisladas de los 597 pacientes diagnosticados durante ese periodo de tiempo.

Sexo: se evidenció una tasa de agrupamiento prácticamente idéntica tanto en hombres como en mujeres con respecto al total de casos; sin embargo al analizar la tasa de agrupamiento de cada sexo separadamente, era ligeramente superior en los hombres.

Sexo	**n**	**Agrupamiento -respecto al total de casos- %**	**Agrupamiento - entre sí- %**
Hombres	430	80	77,6
Mujeres	167	79,3	66,2

Tabla 4.12. Tasa de agrupamiento, detectada por *Spoligotyping* en Asturias, por sexos.

Edad: la mayor tasa de agrupamiento, con respecto a la totalidad de casos, se registró en el rango de edad de 0 a 14 años, siendo del 100%, mientras que los pacientes mayores de 85 años presentaban la menor tasa de agrupamiento (64,5%). Al analizar separadamente el agrupamiento dentro de cada rango, se encontró que la tasa más elevada (79,2%) correspondía al tramo de edad de 35 a 44 años, y la más baja (32,2%) seguía correspondiendo a los mayores de 85 años.

Rango de edad	Pacientes n	Agrupamiento -respecto al total de casos- %	Agrupamiento -entre sí- %
0-14	9	100	54.5
15-24	38	80,6	45,1
25-34	99	77,6	72,3
35-44	105	83,1	79,2
45-54	77	86	67
55-64	67	70,4	55,7
65-74	82	67,5	45,9
75-84	100	82,4	68,1
>85	20	64,5	32,2

Tabla 4.13. Tasa de agrupamiento, detectada por *Spoligotyping* en Asturias, por rango de edad.

Origen de la muestra: al analizar el agrupamiento de manera global, en función de la localización de la tuberculosis, se observó una tasa de agrupamiento similar en las tuberculosis pulmonares como en las extrapulmonares 80% y 78,6% respectivamente. Al analizar el agrupamiento de cada localización de manera separada, se observó que la tasa de agrupamiento era ligeramente superior en las tuberculosis pulmonares.

Localización	Agrupamiento -respecto al total de casos- %	Agrupamiento -entre sí- %
Pulmonar	80	77,4
Extrapulmonar	78,6	68,7

Tabla 4.14. Tasa de agrupamiento, detectada por *Spoligotyping* en Asturias, en relación a la localización de la tuberculosis.

Baciloscopia: Se evidenció una tasa de agrupamiento mayor en las cepas aisladas a partir de muestras con baciloscopia negativa, tanto respecto al total como entre sí.

Baciloscopia	Agrupamiento -respecto al total de casos- %	Agrupamiento -entre sí- %
Positiva	76,1	61,4
Negativa	86,5	74,6

Tabla 4.15. Tasa de agrupamiento, detectada por *Spoligotyping* en Asturias, en relación al resultado de la baciloscopia.

Patrones huérfanos

Se identificaron 81 patrones huérfanos (13,5%) en el tramo intermedio de nuestro estudio. Entre los pacientes con edades comprendidas entre 65 y 74 años eran más frecuentes (22,8% de los patrones huérfanos). Es reseñable que no se identificó ningún patrón huérfano entre los menores de 14 años. En el tramo de edad desde 0 hasta 34 años este tipo de patrones eran mucho menos frecuentes (16,4 % de los patrones huérfanos) que entre los mayores de 65 años (43% de los patrones huérfanos) Tabla 4.16.

Edad	2006 - 2008		
	Pacientes	Patrones únicos	%
0 – 14	9	0	0
15 – 24	38	4	4,9
25 – 34	99	9	11,1
35 – 44	105	16	19,7
45 – 54	77	7	8,6
55 – 64	67	10	12,3
65 – 74	82	19	23,4
75 – 84	100	12	14,8
>85	20	4	4,9

16 %

43,1 %

Tabla 4.16. Patrones huérfanos, detectados por *Spoligotyping* en Asturias, en relación al rango de edad.

Epidemiología de especies

Mediante *Spoligotyping* se identificaron en Asturias diferentes especies incluidas en el taxón *M. tuberculosis* complex: 16 cepas de *M. bovis,* 2 cepas *M. bovis* BCG y 4 cepas *M. africanum* tipo 1. No hubo ningun caso producido por *M. canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedi* o *M. mungi*.

M. bovis:

Durante el periodo 2004 – 2010 se detectaron 16 cepas de *M. bovis* subespecie *bovis*, aisladas a su vez de 16 pacientes diferentes, 3 mujeres y 13 hombres, con una media de edad de 61 años. No hubo ningún caso de *M. bovis* subespecie *caprae*.

Es reseñable que el número de casos desde su irrupción se ha incrementado y estabilizado: ningún caso durante los años 2004 y 2005; 2 casos en 2006; 3 en 2007; 4 en 2008; 4 en 2009 y 3 en 2010. Diez pacientes fueron diagnosticados de tuberculosis pulmonar por *M. bovis* (3 de ellos con baciloscopia positiva), 4 de tuberculosis ganglionar, y 2 de tuberculosis intestinal.

Conviene destacar que 6 de estas cepas (37,5 %) hubieran sido identificadas erróneamente como *M. tuberculosis* si la identificación se hubiera sustentado exclusivamente en las pruebas bioquímicas convencionales, ya que las 6 exhibían resistencia a la TCH a una concentración de 1 µg/ml, prueba considerada de referencia. En la Tabla 4.17 se muestran los datos de los pacientes.

Paciente	Fecha de aislamiento	Edad	Sexo	Area sanitaria	Origen de la muestra
1	Enero 2006	68	Hombre	IV	Esputo
2	Septiembre 2006	47	Hombre	IV	Esputo
3	Julio 2007	57	Hombre	V	Esputo
4	Julio 2007	34	Hombre	V	Biopsia colon
5	Noviembre 2007	86	Hombre	IV	Líquido ascítico
6	Mayo 2008	72	Mujer	I	Biopsia ganglionar
7	Junio 2008	35	Mujer	II	Biopsia ganglionar
8	Agosto 2008	69	Hombre	I	Esputo
9	Diciembre 2008	67	Hombre	IV	Esputo
10	Febrero 2009	82	Mujer	IV	Exudado ganglionar
11	Noviembre 2009	79	Hombre	V	Esputo
12	Noviembre 2009	37	Hombre	V	Biopsia ganglionar
13	Noviembre 2009	81	Hombre	V	Esputo
14	Enero 2010	26	Hombre	V	Esputo
15	Agosto 2010	80	Hombre	V	Esputo
16	Octubre 2010	64	Hombre	IV	Esputo

Tabla 4.17. Casos clínicos de *M. bovis* diagnosticados en Asturias

En cuanto a los patrones genéticos identificados llama la atención que se identificaron 3 *clusters* (de 5, 3 y 2 cepas respectivamente) que implicaban a 10 pacientes, lo que supone una tasa de agrupamiento del 62,5%. En la Tabla 4.18 aparecen los patrones y agrupamientos obtenidos mediante *Spoligotyping*.

Paciente	Año	Área sanitaria	*Spoligotyping*	Valor octal
1	2006	IV		436773676777600
2	2006	IV		616773777777600
9	2008	IV		616773777777600
5	2007	IV		636573777777600
4	2007	V		664063777747600
12	2009	V		666773677777600
6	2008	I		676573777737600
7	2008	II		676573777777600
8	2008	I		676573777777600
10	2009	IV		676573777777600
14	2010	V		676573777777600
16	2010	IV		676573777777600
11	2009	V		676773677777600
13	2009	V		676773677777600
15	2010	V		676773677777600
3	2007	V		676773777477600

Tabla 4.18. Patrones genéticos de los aislados de *M. bovis* en Asturias. Se muestran con un mismo color los números de los pacientes incluidos en el mismo *cluster*; sin colorear aparecen los patrones huérfanos.

En colaboración con el Laboratorio de Sanidad Animal de Jove en Gijón (Dra. M. Francisca Copano) y del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria de la Universidad Complutense (Dra. Beatriz Romero y Dra. Lucía de Juan) se compararon los patrones de *Spoligotyping* de estos 16 pacientes con la base de datos VISAVET de genotipos de *M. bovis* de origen animal.

En la Tabla 4.19 se puede observar que los patrones genéticos de 14 de los 16 pacientes son coincidentes con aislamientos de *M. bovis* en ganado vacuno en Asturias, pero en los 2 sasos restantes, esos patrones no han sido identificados en ganado en Asturias pero sí en ganado de otras zonas de España.

Nº de identificación del paciente	Nº de pacientes que compartían un mismo genotipo	Código octal	SB CODE	Nº casos en ganado con idéntico patrón genético
7, 8, 10, 14, 16	5	676573777777600	SB0130	89
11, 13, 15	3	676773677777600	SB0121	270
2, 9	2	616773777777600	SB0134	19
12	1	666773677777600	SB0265	93
1	1	436773676777600	SB1305	24
3	1	676773777477600	SB1569	NO en Asturias, SI en España
4	1	664063777747600	SB1641	NO en Asturias, SI en España
5	1	636573777777600	SB1019	28
6	1	676573777737600	SB1312	24

Tabla 4.19. Comparación de patrones genéticos de *M. bovis* de origen humano y animal.

M. bovis BCG:

Se trataba de dos cepas aisladas en localizaciones a distancia en el contexto de pacientes tratados con instilaciones de BCG por carcinoma transicional de vejiga.

Nº Paciente	Fecha de aislamiento	Edad	Sexo	Area Sanitaria	Origen muestra
1	Enero 2008	84	Hombre	IV	Pus
2	Abril 2010	58	Hombre	I	Absceso

Tabla 4.20. Datos de los pacientes con *M.bovis* BCG.

Ambas mostraban el mismo patrón de *Spoligotyping*.

Nº Paciente	*Spoligotyping*	Código octal
1		676773777777600
2		676773777777600

Tabla 4.21. Patrones genéticos de los casos de *M.bovis* BCG.

M. africanum tipo 1:

Durante el periodo del estudio se identificaron en Asturias 4 cepas de *M. africanum* tipo 1, la irrupción de esta especie en Asturias se produce en abril de 2008, no figurando antes ningún caso documentado en nuestra Comunidad Autónoma. Tres casos diagnosticados en pacientes de origen africano (dos hombres y una mujer) todos residentes en el Área IV y uno (un hombre de origen español, indigente, frecuentador habitual de albergues de acogida, sin antecedentes conocidos de viajes o estancias en zonas endémicas) en el Área VI. La edad media de los pacientes era de 40 años. En todos los casos las baciloscopias eran positivas. Todas las cepas eran sensibles a PZ, INH, RIF, EB y SM. En las historias clínicas de los pacientes consta que todos completaron el tratamiento y que fueron alta médica por curación. Los datos de los pacientes aparecen resumidos en la Tabla 4.22.

Fecha de aislamiento	Nº de Paciente	País de origen	Tiempo de estancia en España	Edad	Sexo	Área sanitaria	Muestra
Abril 2008	1	España	-	55	Varón	VI	Esputo
Octubre 2008	2	Guinea Ecuatorial	9 meses	52	Mujer	IV	Esputo
Noviembre 2008	3	Senegal	3 años	24	Varón	IV	Biopsia ósea
Mayo 2009	4	Senegal	2 años	29	Varón	IV	Esputo

Tabla 4.22. Casos clínicos de *M. africanum* tipo 1 diagnosticados en Asturias

Mediante *Spoligotyping* se comprobó que los cuatro patrones genéticos eran diferentes, por lo que ningún caso guardaba relación epidemiológica con los otros. Tampoco se ha detectado hasta la fecha ningún caso secundario de estos pacientes a pesar de que todos eran bacilíferos.

Nº de paciente	*Spoligotyping*	Código octal
1		770777777777671
2		774077606777771
3		770777707777771
4		770757777777671

Tabla 4.23. Patrones de *Spoligotyping* de las cepas de *M. africanum* tipo 1.

Familia Beijing:

Durante el periodo 2004-2010 se han identificado en Asturias 4 cepas con genotipo correspondiente a la denominada familia Beijing. La irrupción de esta cepa en Asturias se produjo en marzo de 2006, no existiendo anteriormente ningún caso documentado en nuestra Comunidad. Tres casos se diagnosticaron en pacientes de origen extranjero (Sudamérica, Europa del Este y China), y un caso en una paciente de origen español. Los pacientes extranjeros eran jóvenes con una media de edad de 28,6 años, mientras que la paciente española era una anciana de 83 años. Los datos de los pacientes y el origen de las muestras aparecen resumidos en la Tabla 4.24.

Fecha de aislamiento	Identificación Paciente	País de origen	Edad	Sexo	Área sanitaria	Muestra
Marzo 2006	1	Rumanía	26	Mujer	Cabueñes	Esputo
Septiembre 2008	2	Uruguay	24	Mujer	Avilés	Esputo
Octubre 2009	3	España	83	Mujer	Cangas	Esputo
Noviembre 2010	4	China	36	Hombre	Cabueñes	Esputo

Tabla 4.24. Datos de los pacientes con cepas genotipo Beijing.

Las 4 cepas presentaban por *Spoligotyping* el patrón característico de la familia Beijing: ausencia de todos los espaciadores del 1 al 34 y presencia de espaciadores 35 al 43, tal y como puede verse en la Tabla 4.25.

Nº de paciente	*Spoligotyping*	Código octal
1		000000000003771
2		000000000003771
3		000000000003771
4		000000000003771

Tabla 4.25. Patrones de *Spoligotyping* de las cepas genotipo Beijing

En cuanto al antibiograma, solamente una cepa era multirresistente; otra exhibía polirresistencia; y dos eran sensibles a todos los fármacos de primera y segunda línea. En la Tabla 4.26 se muestran estos resultados de manera más detallada.

Fármaco	PZA	INH	RIF	EB	SM	RFB	CIP	CH	LZD	ETH	AK	CAP	PAS	CLO	KA
Paciente															
1	S	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R
2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R

PZA pirazinamida; INH isoniacida; RIF rifampicina; EB etambutol; SM estreptomicina; RFB rifabutina; CIP ciprofloxacino; CH claritromicina; LZD linezolid; ETH etionamida; AK amikacina; CAP capreomicina; PAS ácido paraaminosalicílico; CLO clofazimina; KA kanamicina.

Tabla 4.26. Perfiles de sensibilidad de las cepas Beijing aisladas en Asturias

Tuberculosis multirresistente en Asturias, cepas MDR-TB:

Todas las cepas multirresistentes identificadas en Asturias por *Spoligotyping* eran diferentes entre sí, 4 de ellas representaban patrones huérfanos en la base de datos, y 3 estaban clusterizadas con otras cepas pero estas últimas no eran MDR-TB.

	Nº Registro	*Spoligotyping*	Valor octal
1	204003894		017625606640751
2	205006130		776177607760771
3	307007911		777617777720771
4	307009709		777777777760731
5	309006873		777774077020771
6	309010761		757777777760771
7	310007404		000000000003771

Tabla 4.27. Patrones de *Spoligotyping* de las cepas multirresistentes

RFLP - IS6110

El análisis comparativo de los patrones obtenidos mediante la técnica RFLP-IS6110 en presente estudio fue realizado mediante el software específico *Fingerprinting Informatix* 3.0 (Bio-Rad). Las variaciones inter-experimento inherentes a la técnica RFLP-IS6110 fueron corregidas estableciendo los límites de tolerancia y optimización más próximos a la interpretación visual:

Tolerancia: Máxima diferencia de tamaño permitida entre dos bandas para que se consideren como iguales.

Optimización: Máxima diferencia permitida entre dos patrones completos para que sean considerados iguales.

En la Tabla 4.28 se muestra la influencia de estos parámetros sobre la tasa de agrupamiento.

Otimización	**1%**	**1%**	**3%**
Tolerancia	**1 %**	**2%**	**5%**
Clusters			
2	90	108	125
3	24	35	59
4	12	9	33
5	5	4	23
6	1	2	9
7	1	1	5
8	1	1	2
9	1	-	4
10	1	2	1
11	-	3	1
12	-	1	3
13	-	-	-
14	-	-	3
15	-	1	1
16	-	-	-
17	-	-	1
18	-	-	1
Agrupamiento	29,6	39,3	78,3

Tabla 4.28. Modificación de la tasa de agrupamiento en función de los criterios de optimización y tolerancia de la técnica RFLP-IS6110.

En el presente estudio, los resultados se presentan una vez optimizado el análisis comparativo: optimización 1%, tolerancia 2%.

Se completó la identificación mediante esta técnica en 1230 cepas de las 1255 incluidas en el estudio, lo que supone el 98% del total. En 25 cepas (1,9%) la identificación no fue posible porque, o bien la cepa recibida no era viable o había sido remitida en condiciones inadecuadas, o por motivos exclusivamente técnicos.

Se identificaron un total de 913 patrones RFLP-IS6110 diferentes, lo que permite constatar, al igual que ocurría con el *Spoligotyping*, una gran diversidad de genotipos de *M. tuberculosis* "circulantes" en Asturias. Se identificaron 167 *clusters* -o agrupamientos- que englobaban a un total de 484 cepas lo que supone que en Asturias la tasa de agrupamiento detectada mediante RFLP-IS610 durante el periodo 2004-2010 fue del 39,3%. Los *clusters* eran muy heterogéneos en cuanto al número de cepas que formaban parte de ellos, cubrían un rango que iba desde los *clusters* más frecuentes, los que estaban integrados por 2 cepas idénticas (había 108 *clusters* de este tipo los cuales, a su vez, eran diferentes entre sí), hasta el *cluster* más numeroso que estaba formado por 15 cepas genéticamente idénticas. Asimismo, se identificaron 746 cepas con patrones huérfanos -o únicos- lo que representaba el 60,6% del total. En la Tabla 4.29 se muestran todos los *clusters* identificados desglosados de acuerdo a la composición en cuanto al número de cepas integrantes.

Nº de clusters	Nº de cepas	%
108	2	64,7
35	3	21
9	4	5,4
4	5	2,4
2	6	1,2
1	7	-
1	8	0,6
-	9	-
2	10	1,2
3	11	1,8
1	12	0,6
-	13	-
-	14	-
1	15	0,6

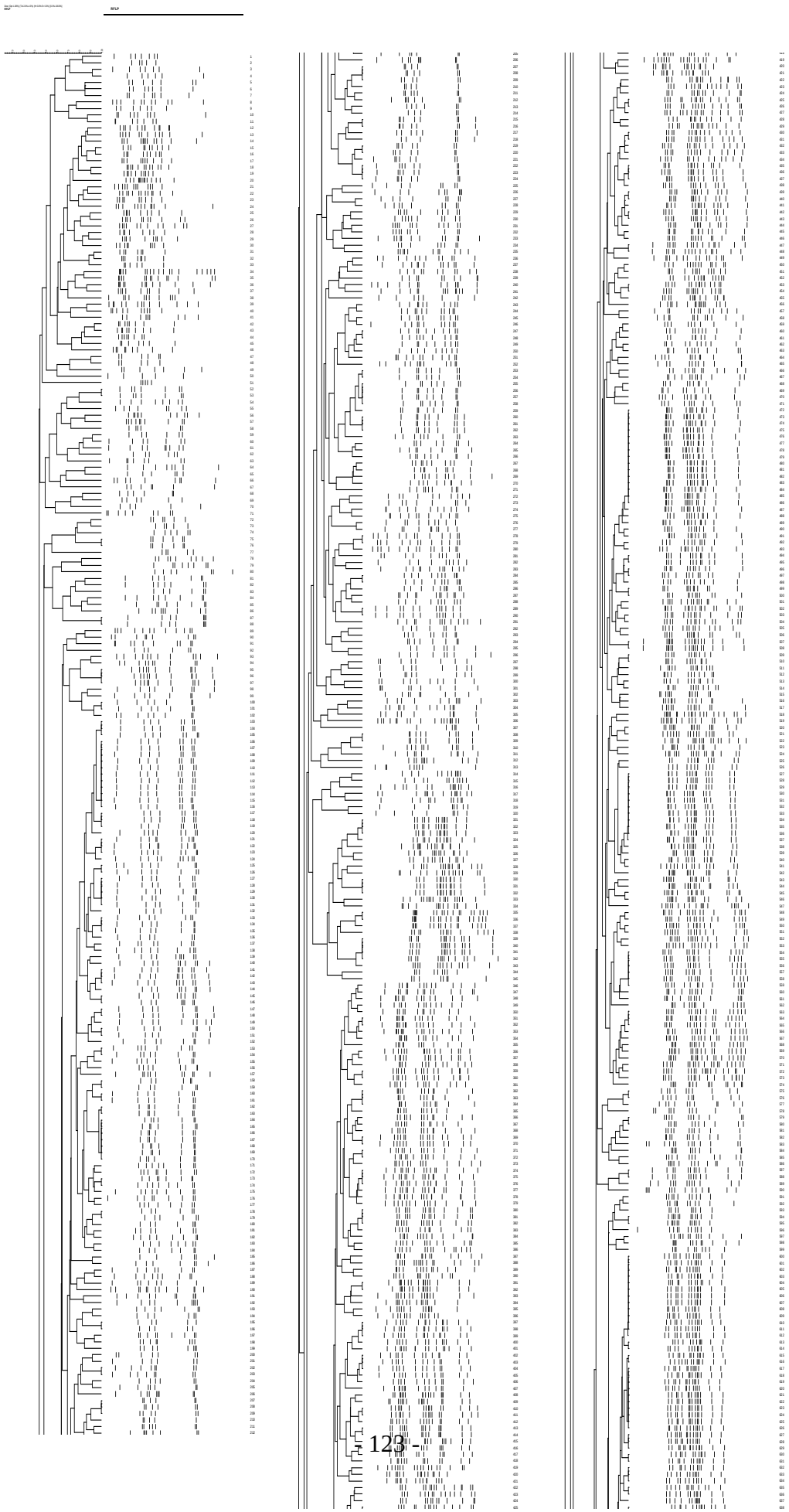
Tabla 4.29. *Clusters* de cepas de *M. tuberculosis* identificados por RFLP-IS6110 en Asturias durante el periodo 2004-2010, optimización 1%, tolerancia 2%.

La media de copias de la secuencia de inserción IS6110 en las 1230 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* complex fue de 10,38 (mediana 10, desviación típica 3,35), en la Tabla 4.30 se presentan estos datos de manera detallada. El 80 % (984 cepas) presentaban $\geq$8 copias; mientras que el 20% restante (246 cepas) tenían $\leq$7 copias.

Nº de copias IS6110	Nº de cepas
1	19
2	5
3	1
4	7
5	29
6	72
7	114
8	135
9	123
10	141
11	118
12	127
13	111
14	100
15	57
16	28
17	25
18	7
19	9
20	0
21	2

Tabla 4.30. Número de copias de IS6110 en las cepas de *M. tuberculosis* complex identificados por RFLP-IS6110 en Asturias durante el periodo 2004-2010.

Patrones de RFLP-IS6110 identificados en Asturias



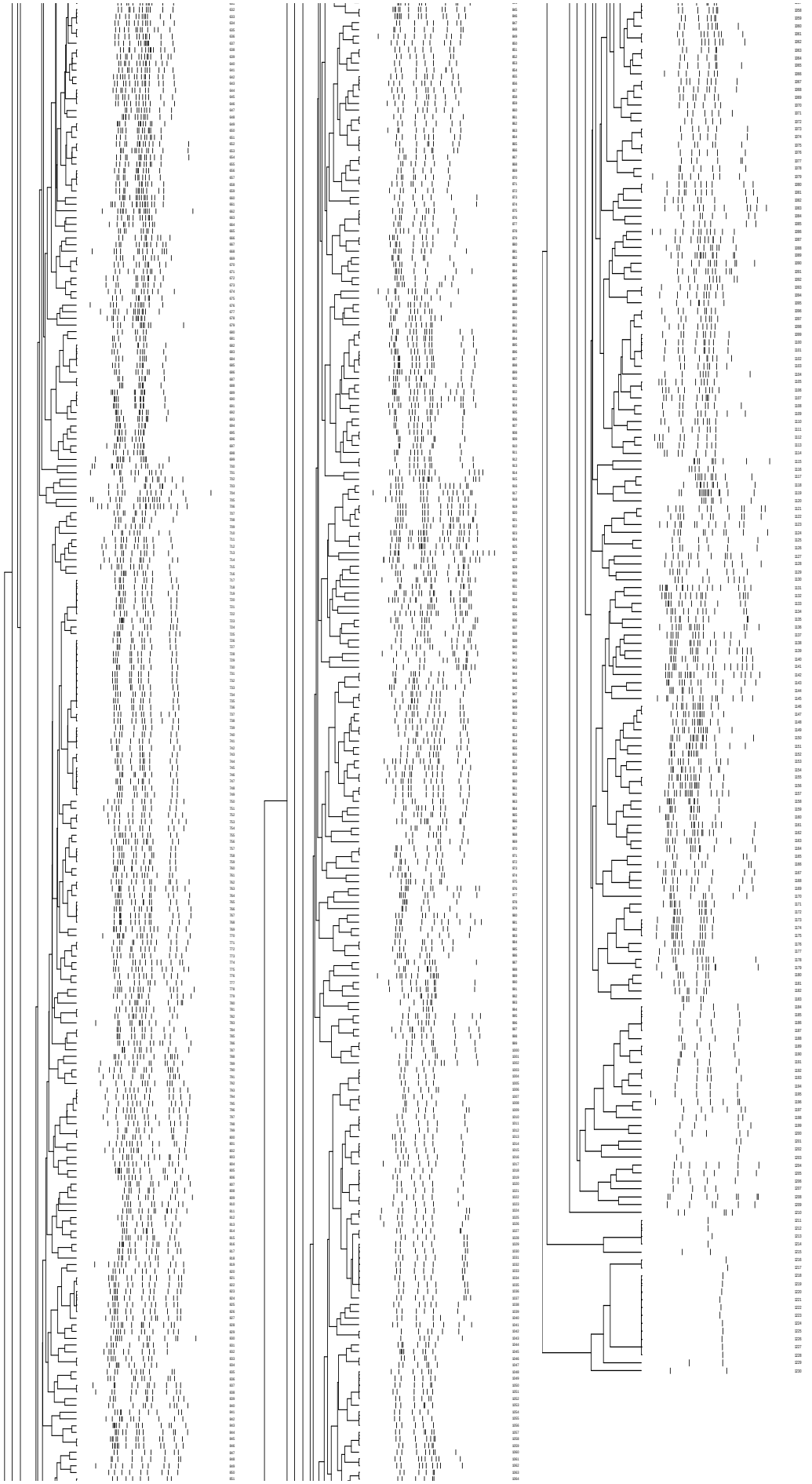


Fig.4.7. Patrones de *M. tuberculosis* identificados por RFLP-IS6110 en Asturias durante el periodo 2004-2010

Distribución de los *clusters* por áreas sanitarias

Del total de 167 *clusters*, 38 (22,7 %) estaban formados por cepas aisladas exclusivamente en un área sanitaria determinada, mientras que 129 (77,2 %) incluían cepas aisladas en dos o más áreas sanitarias del Principado de Asturias (*clusters* mixtos). El Área VI y el Área VII presentaban las tasas de agrupamiento más bajas (0 % y 4,4 % respectivamente); mientras que el Área IV registraba la tasa de agrupamiento más alta (41,4 %). En la Tabla 4.31 se muestran estos datos desglosados por áreas sanitarias.

Área	Tasa de Agrupamiento %
I	12,1
II	5,7
III	25,5
IV	41,4
V	31,8
VI	0
VII	4,4
VIII	27

Tabla 4.31. Tasa de agrupamiento, detectada por RFLP-IS6110 en Asturias periodo 2004-2010, por área sanitaria.

Entre los 108 *clusters* formados por 2 cepas, había 30 de ellos que estaban formados por cepas aisladas exclusivamente en un Área sanitaria determinada, y otros 78 que eran mixtos.

Algo similar ocurría con los 35 *clusters* formados por 3 cepas, había 7 que estaban formados por cepas aisladas exclusivamente en un Área sanitaria determinada, y otros 28 que eran mixtos.

En cuanto a los 9 *clusters* formados por 4 cepas, solamente había 1 que era exclusivo de un Área (Área IV), el resto eran mixtos.

Todos los *clusters* con más de 5 cepas eran mixtos.

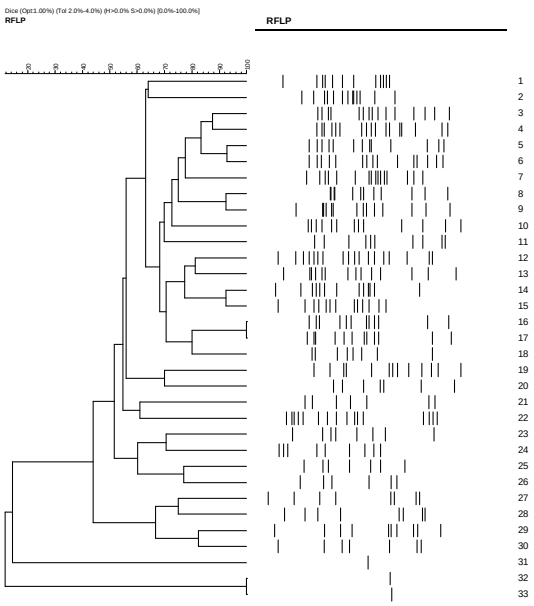


Fig. 4.8. Patrones de *M. tuberculosis* identificados por RFLP-IS6110 en el área Sanitaria I- (Hospital de Jarrio) 2004-2010

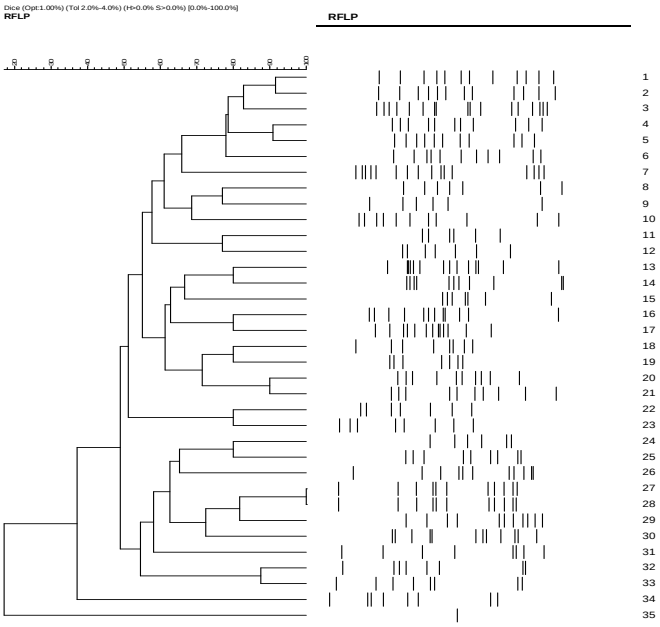


Fig 4.9. Patrones de *M. tuberculosis* identificados por RFLP-IS6110 en el área Sanitaria II-(Hospital Carmen y Severo Ochoa) 2004-2010

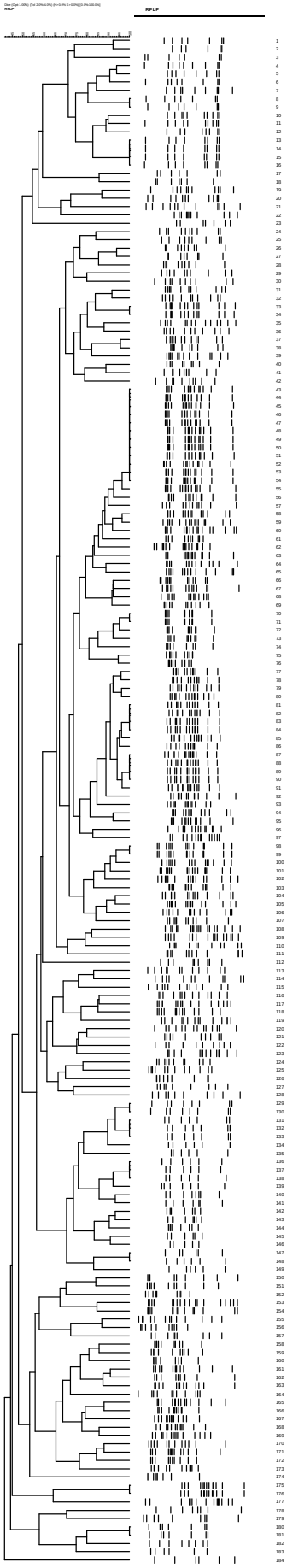


Fig 4.10. Patrones de *M. tuberculosis* identificados por RFLP-IS6110 en el área Sanitaria III- (Hospital San Agustín) 2004-2010

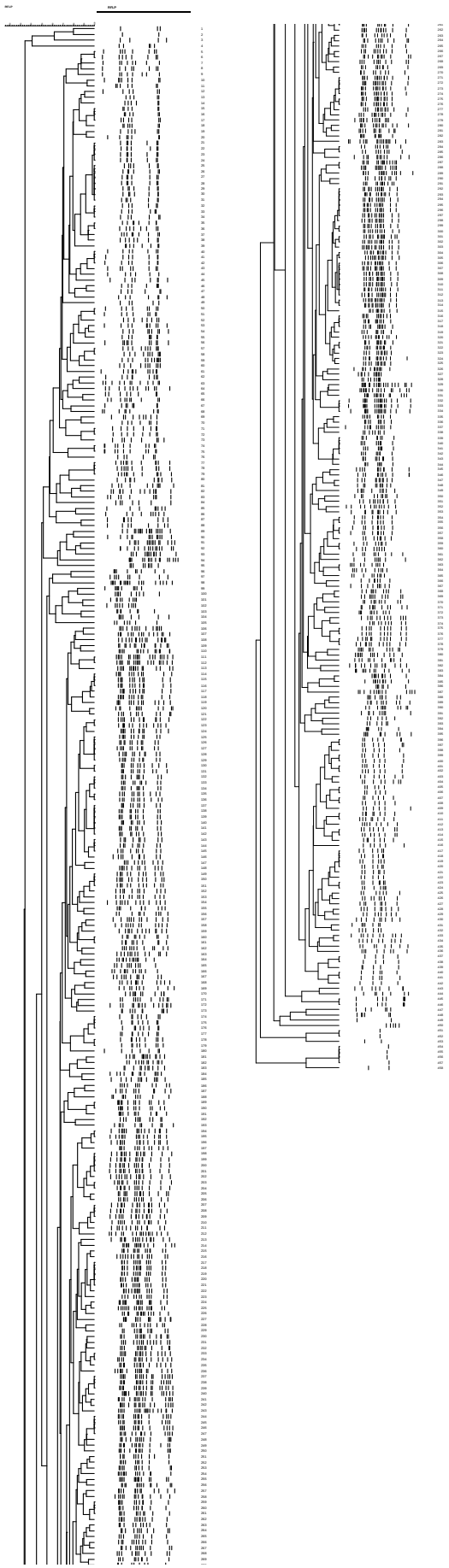


Fig 4.11. Patrones de *M. tuberculosis* identificados por RFLP-IS6110 en el área Sanitaria IV- (Hospital Universitario Central de Asturias y Hospital Monte Naranco) 2004-2010

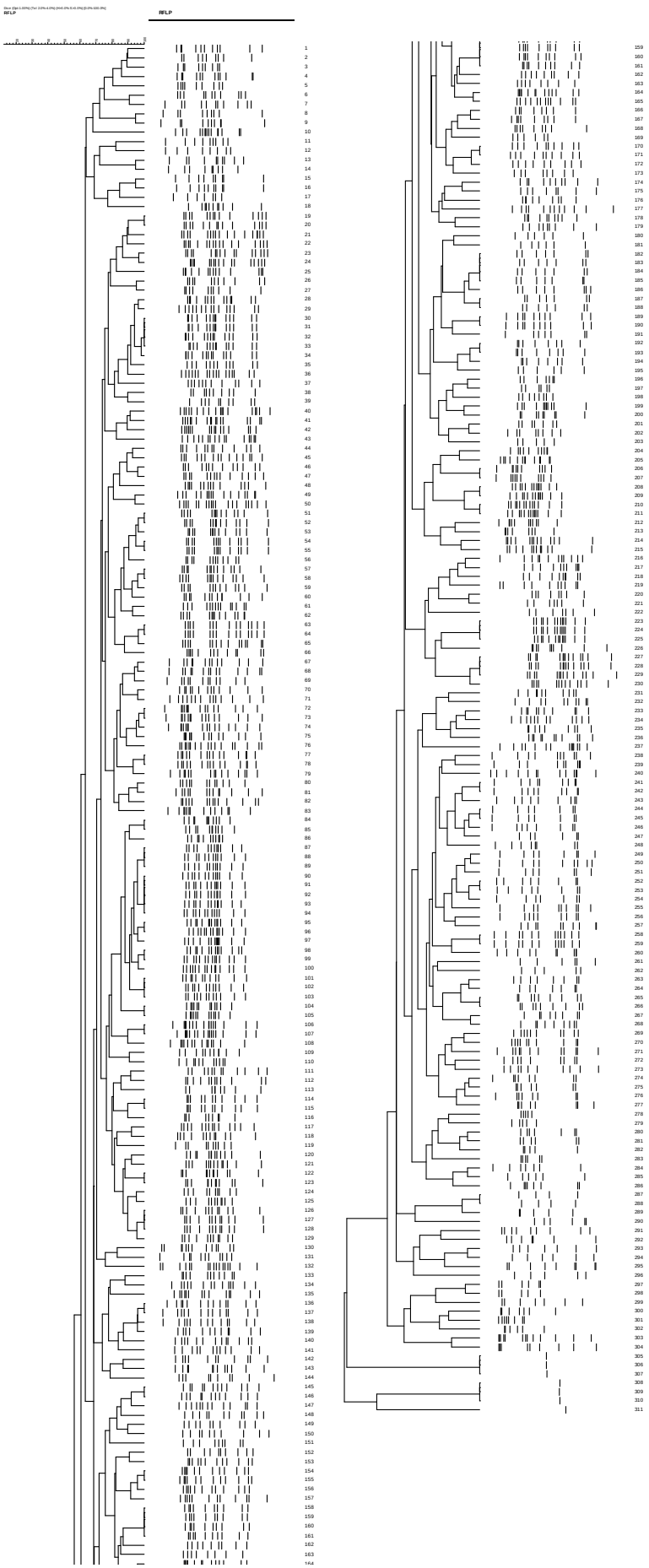


Fig 4.12. Patrones de *M. tuberculosis* identificados por RFLP-IS6110 en el área Sanitaria V-(Hopital de Cabueñes y Hospital de Jove) 2004-2010

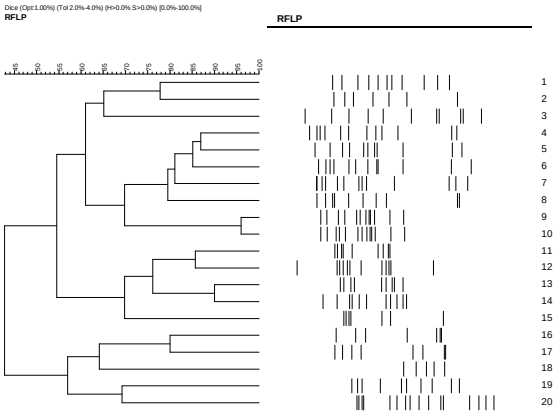


Fig 4.13. Patrones de *M. tuberculosis* identificados por RFLP-IS6110 en el área Sanitaria VI- (Hospital Grande Covián) 2004-2010

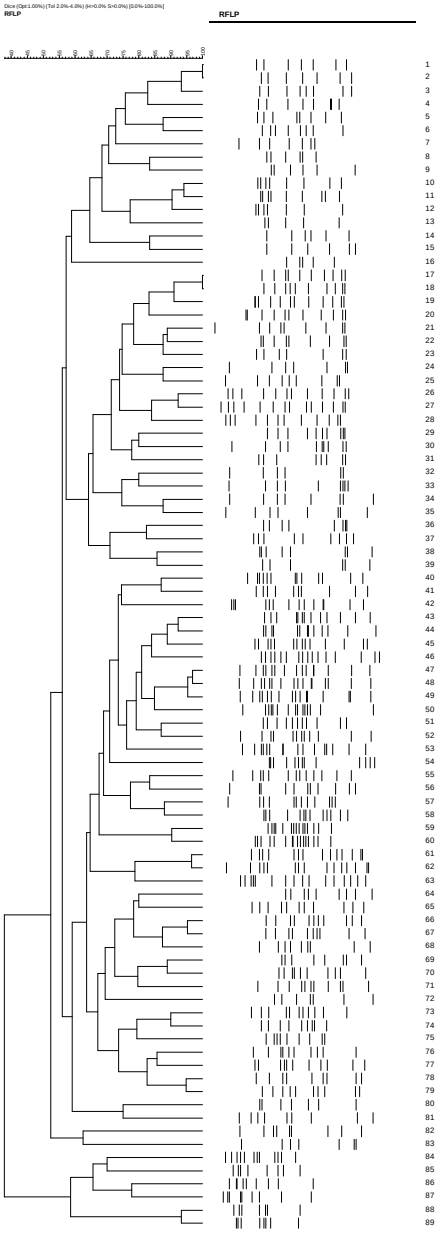


Fig 4.14. Patrones de *M. tuberculosis* identificados por RFLP-IS6110 en el área Sanitaria VII- (Hospital Vital Álvarez-Buylla) 2004-2010

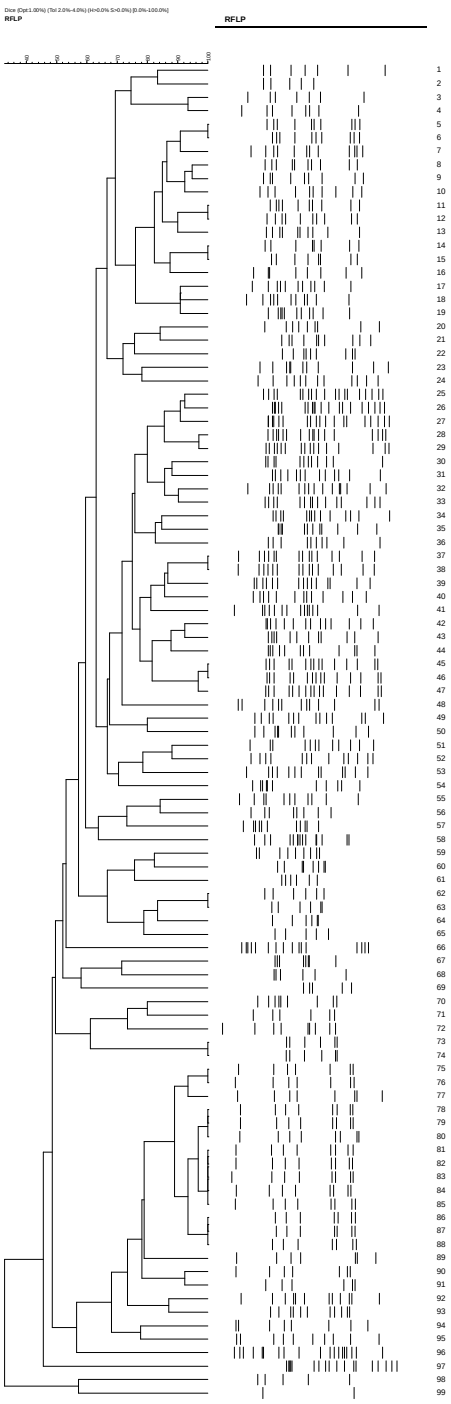
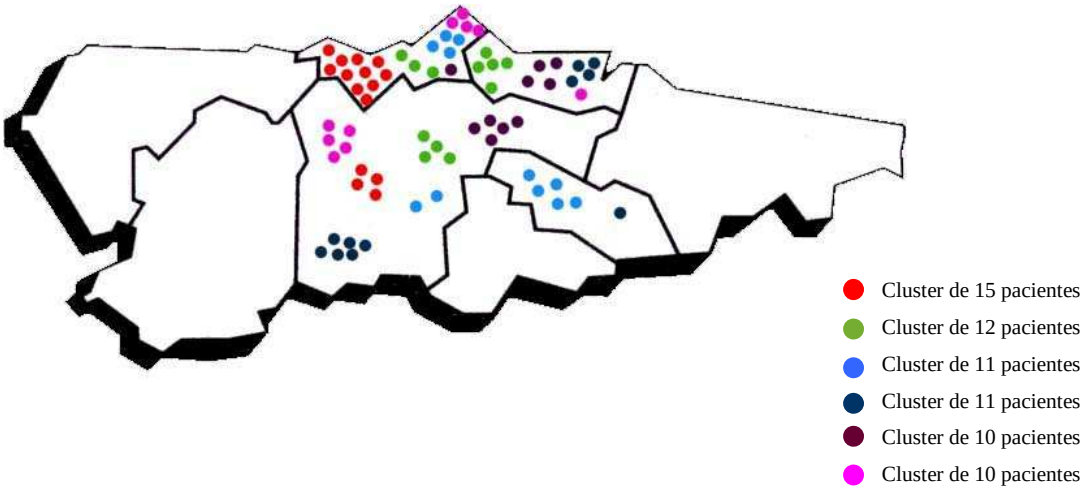


Fig 4.15. Patrones de *M. tuberculosis* identificados por RFLP-IS6110 en el área Sanitaria VIII- (Hospital Valle del Nalón) 2004-2010

Distribución geográfica de los *clusters* más significativos identificados por RFLP-IS6110

A lo largo del periodo de estudio se identificaron 7 *clusters** que aglutinaban a 10 ó más pacientes, la distribución geográfica de los mismos se muestra en la figura.



*No se incluye un *cluster* de 11 cepas formado por *M. bovis*.

Fig 4.16. Distribución geográfica de los *clusters* más amplios identificados por RFLP-IS6110 en Asturias, periodo 2004-2010.

En lo referente a las tasas de agrupamiento desglosadas por sexo, edad, origen de la muestra, y baciloscopia; se procedió del mismo modo al descrito para la técnica de *spoligotyping*, acotando el mismo periodo de tiempo e incluyendo las mismas cepas de los 597 pacientes diagnosticados en el tramo intermedio de nuestro estudio (2006-2007-2008):

Sexo: Se evidenció una tasa de agrupamiento prácticamente igual tanto en hombres como en mujeres. La tasa de agrupamiento de hombres entre sí era un 11% más alta en hombres.

Sexo	n	Agrupamiento -respecto al total de casos- %	Agrupamiento - entre sí- %
Hombres	430	35,1	26,3
Mujeres	167	36,3	17,3

Tabla 4.32. Tasa de agrupamiento, detectada por RFLP-IS6110 en Asturias, por sexos.

Edad: Las mayores tasas de agrupamiento, con respecto al total de casos, se registraron en los rangos de edad correspondientes a los pacientes más jóvenes: 0-14 años, 60%; 15-24 años, 50%. La menor tasa de agrupamiento (24,6%) se registró en el rango de 65-74 años. Al analizar el agrupamiento de los pacientes de cada rango de edad entre sí, se evidenció que los pacientes de 0 a 14 años seguían presentando una tasa de agrupamiento muy superior (40%) a la de otros rangos de edad; asimismo, es reseñable que no había agrupamiento alguno de los pacientes mayores de 85 años entre sí.

Rango de edad	Pacientes n	Agrupamiento -respecto al total de casos- %	Agrupamiento - entre sí- %
0-14	9	60	40
15-24	38	50	13,3
25-34	99	35,1	10,8
35-44	105	42,1	15,6
45-54	77	36,3	12,1
55-64	67	27,7	7,4
65-74	82	24,6	13
75-84	100	27,7	12,2
>85	20	35	0

Tabla 4.33. Tasa de agrupamiento, detectada por RFLP-IS6110 en Asturias, por rango de edad.

Origen de la muestra: Al analizar el agrupamiento en función de la localización de la tuberculosis, se evidenció una tasa de agrupamiento mayor en las tuberculosis pulmonares.

Localización	Agrupamiento -respecto al total de casos- %	Agrupamiento - entre sí- %
Pulmonar	34	28,3
Extrapulmonar	20	10,8

Tabla 4.34. Tasa de agrupamiento, detectada por RFLP-IS6110 en Asturias, en relación a la localización de la tuberculosis.

Baciloscopia: La tasa de agrupamiento fue mayor en las cepas aisladas a partir de muestras con baciloscopia positiva.

Baciloscopia	Agrupamiento -respecto al total de casos- %	Agrupamiento - entre sí- %
Positiva	34,5	13,1
Negativa	26,6	4,2

Tabla 4.35. Tasa de agrupamiento, detectada por RFLP-IS6110 en Asturias, en relación al resultado de la baciloscopia.

Patrones huérfanos

Se identificaron 326 patrones huérfanos (54,6%) en el tramo intermedio de nuestro estudio. Entre los pacientes con edades comprendidas entre 75 y 84 años eran más frecuentes (19,9% de los patrones huérfanos). Es reseñable que entre los menores de 14 años solamente el 1,2% eran patrones huérfanos. En el tramo de edad desde 0 hasta 34 años este tipo de patrones eran mucho menos frecuentes (20,5 % de los patrones huérfanos) que entre los mayores de 65 años 39,7% de los patrones huérfanos) Tabla 4.36.

Edad	2006 - 2008		
	Pacientes	Patrones únicos	%
0 – 14	9	4	1,2
15 – 24	38	15	4,6
25 – 34	99	48	14,7
35 – 44	105	48	14,7
45 – 54	77	42	12,8
55 – 64	67	39	11,9
65 – 74	82	52	15,9
75 – 84	100	65	19,9
>85	20	13	3,9

20,5%

39,7%

Tabla 4.36. Patrones huérfanos, detectados por RFLP-IS6110 en Asturias, en relación al rango de edad.

Epidemiología de especies

M. bovis:

Las 16 cepas de *M. bovis* subespecie *bovis*, aisladas durante el periodo 2004 – 2010, presentaban solamente 1 ó 2 bandas. Por debajo del límite de discriminación de la técnica RFLP-IS6110, menos de 6 bandas, se desaconseja extraer conclusiones de cualquier estudio comparativo de patrones.

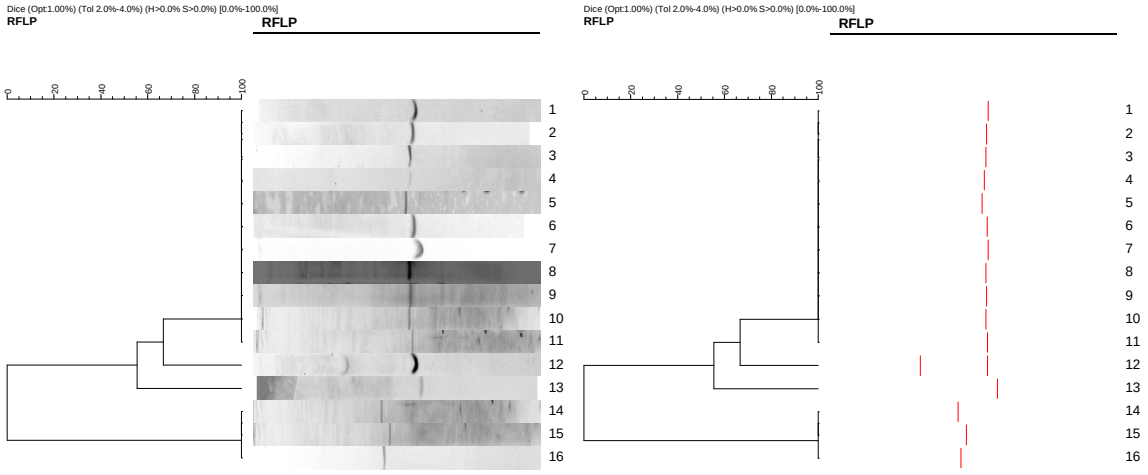


Fig. 4.17. Patrones de RFLP de las cepas de *M.bovis*.

M. bovis BCG:

Como se ha dicho anteriormente, se trataba de dos cepas aisladas en localizaciones a distancia en el contexto de pacientes tratados con instilaciones de BCG por carcinoma transicional de vejiga.

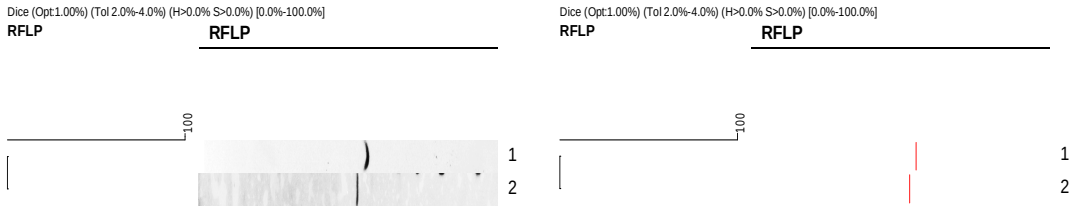


Fig. 4.18. Patrones de RFLP-IS6110 de las cepas de *M. bovis* BCG.

M. africanum:

Tres de las cuatro cepas de *M. africanum* presentan patrones diferentes de *Spoligotyping*. No fue viable la cuarta cepa y no se pudo obtener imágen.

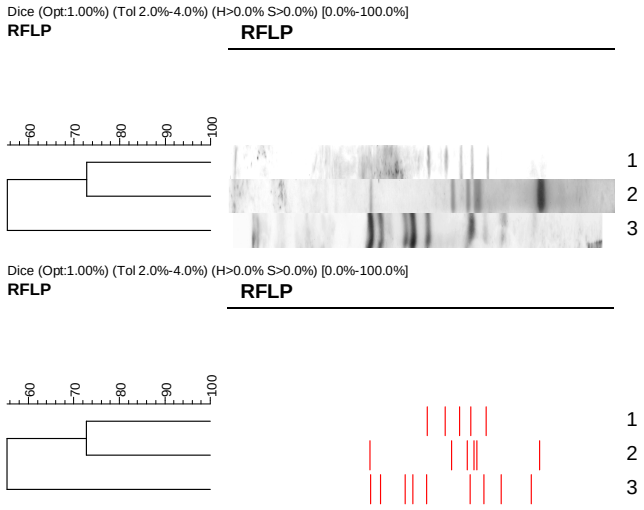


Fig. 4.19. Patrones de RFLP-IS6110 de las cepas de *M.africanum*

Familia Beijing:

Ninguna de las 4 cepas de la familia Beijing presentaban agrupamientos entre sí por RFLP-IS6110.

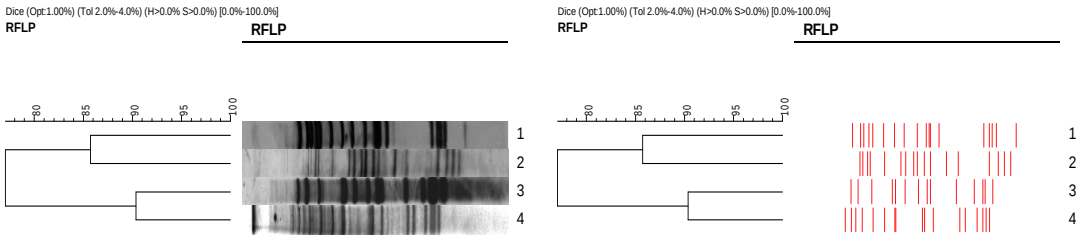


Fig. 4.20. Patrones de RFLP-IS6110 de las cuatro cepas Beijing.

Tuberculosis multirresistente

Las 7 cepas multirresistentes (1 era además XDR-TB) eran diferentes entre sí, una de las cepas presentaba el mismo patrón genético por RFLP-IS6110 que otra cepa aislada en Asturias, pero esta última era resistente solamente a isoniacida.

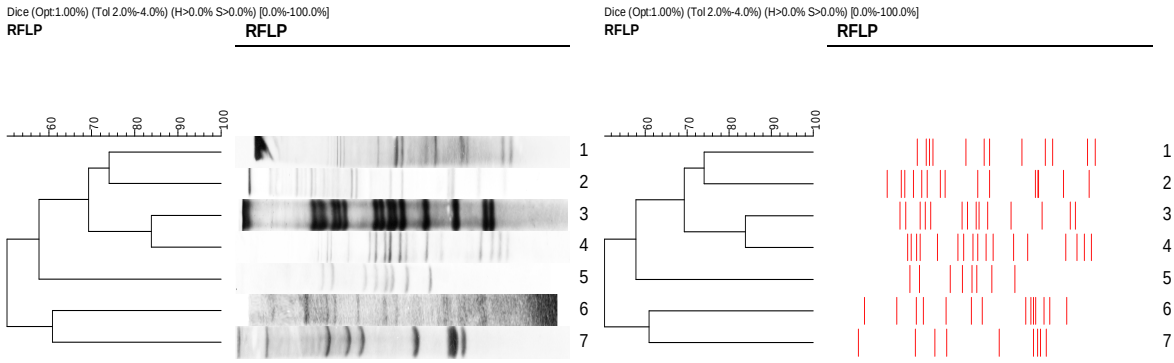
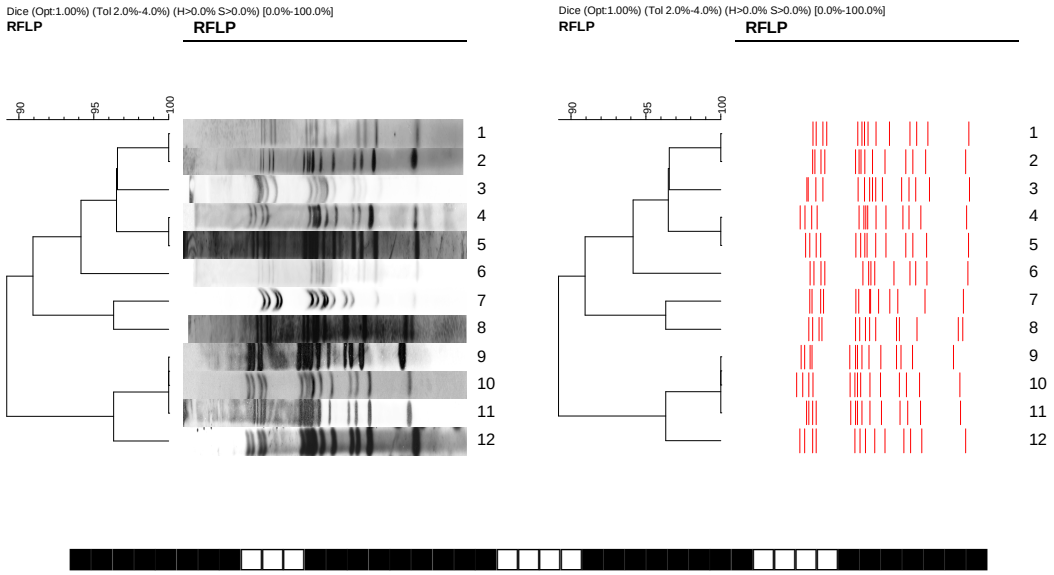


Fig. 4.21. Patrones de RFLP-IS6110 de las cepas multirresistentes.

Coincidencias/discrepancias entre los agrupamientos detectados por *Spoligotyping* y RFLP-IS6110:

Los agrupamientos detectados por RFLP-IS610 y *Spoligotyping* fueron coincidentes en un 19,5% y discrepantes en un 80,5%. Todas las cepas que eran iguales por RFLP-IS6110 también lo fueron por *Spoligotyping*, sin embargo, no todas las cepas que eran iguales por *Spoligotyping* lo fueron por RFLP-IS6110. Del 80,5% de los agrupamientos discrepantes entre las dos técnicas, un 56,5% estaba representado por cepas iguales por *Spoligotyping* pero "muy diferentes" por RFLP-IS6110; y el 24% restante por cepas iguales por *Spoligotyping* diferentes, pero "casi idénticas", por RFLP-IS6110 (igual distribución de bandas +/- 1 ó 2 bandas). En la Figura 4.22 se muestra el ejemplo de un *cluster* por *Spoligotyping* que se "fragmenta" en *clusters* menores por RFLP-6110 con patrones de bandas que abarcan desde los "muy diferentes" a los "casi idénticos" [61].



Valor Octal: 776177607760771 – SIT: 33

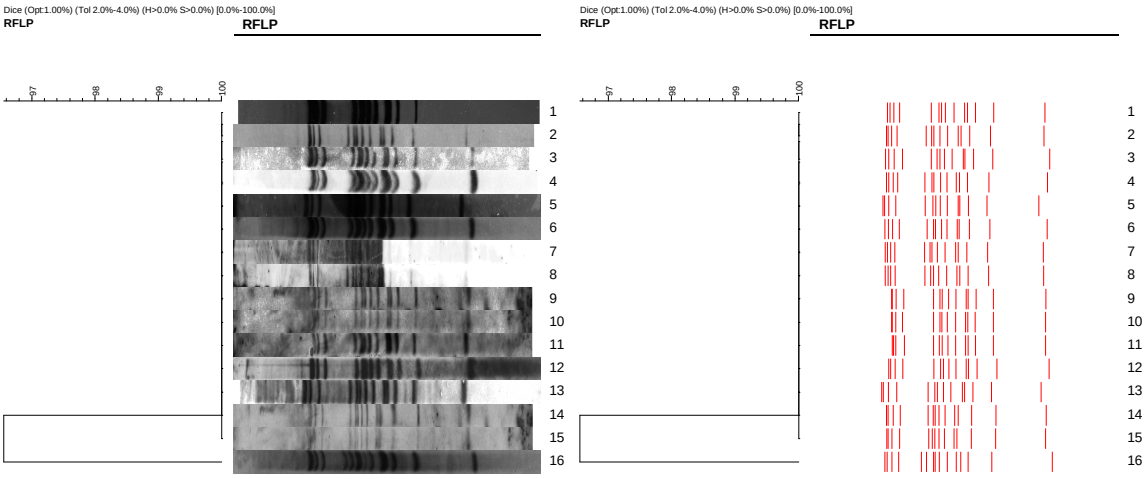
Fig.4.22. Patrones de RFLP-IS6110 diversos para un mismo patrón de *Spoligotyping*.

Tuberculosis Miliar: Patrones identificados por *Spoligotyping* y RFLP-IS6110 en las cepas aisladas en diferentes órganos de un mismo paciente

En 18 casos de tuberculosis miliar y/o ganglionar + respiratoria (1,43% del total de casos de tuberculosis) diagnosticados durante el periodo de estudio tuvimos acceso a las cepas aisladas en las diferentes localizaciones del organismo de un mismo paciente. En todos los casos, los patrones genéticos identificados por *Spoligotyping* siempre fueron iguales entre las cepas aisladas de diferentes órganos de un mismo paciente. En lo que se refiere al RFLP-IS6110, en 13 pacientes los patrones fueron iguales entre las cepas aisladas de diferentes órganos, pero en 3 (16,6%) los patrones identificados por RFLP-IS6110 eran diferentes, pero "casi idénticos" [61].

Algunos ejemplos de la utilidad de las Técnicas Moleculares en diferentes contextos clínicos.

1. Alerta recibida desde la Sección de Vigilancia Epidemiológica del Principado de Asturias: 5 casos de tuberculosis diagnosticados entre marzo y agosto de 2008 en pacientes jóvenes, residentes en el área sanitaria III, y que son amigos entre sí. Se solicitó estudio molecular para identificar cadenas de transmisión. Resultado del estudio: se pudo confirmar la pertenencia de los 5 casos a la misma cadena de transmisión, pero se evidenciaron además otros 11 casos en la misma cadena de transmisión que no habían sido detectados por la metodología convencional. Finalmente, el *cluster* agrupaba a 16 pacientes; asimismo, se pudo identificar y localizar la fuente del contagio, el caso índice había sido diagnosticado en julio de 2005. A posteriori, vía convencional, se confirmaron vínculos en 13 de los 16 casos.



Valor Octal: 777777607760771- SITVIT: 42

Fig. 4.23. Patrones de RFLP-IS6110 de un cluster en Avilés

Fecha	Sexo	Edad	Localidad	Estudio radiológico	Evolución	Bk
Julio 2005	Hombre	44	Grado	Rx Cavitación bilateral	10 días	+
Julio 2005	Hombre	23	Avilés	Rx Infiltrado bilateral	7 días	-
Julio 2005	Hombre	21	Avilés	Rx Cavitación LSD	4 días	+
Enero 2006	Mujer	25	Avilés	Rx Infiltrado bilateral	3 meses	+
Febrero 2006	Hombre	51	Avilés	Rx Cavitación LSD	2 semanas	+
Mayo 2006	Hombre	28	Grado	Rx Infiltrado difuso cavitado	1 mes	+
Diciembre 2006	Hombre	27	Grado	Rx Cavitaciones bilaterales	1mes	+
Noviembre 2007	Mujer	30	Salinas	Rx Cavitación LSD	1 mes	+
Noviembre 2007	Hombre	10 meses	Salinas	TAC Adenopatías+ infiltrados	7 días	-
Marzo 2008	Hombre	34	Avilés	Rx Infiltrado cavitado LSI	1 mes	+
Abril 2008	Hombre	32	Avilés	Rx Derrame pleural + condensación	10 días	+
Abril 2008	Hombre	27	Avilés	Rx Derrame pleural	7días	-
Abril 2008	Mujer	64	Salinas	Rx Normal TBC endobronquial	4 meses	-
Mayo 2008	Hombre	22	Avilés	Rx Derrame pleural + infiltrado	10 días	-
Agosto 2008	Mujer	47	Avilés	Rx Infiltrado LSD	5 meses	+
Agosto 2008	Hombre	25	Avilés	Rx Derrame pleural	10 días	-

Tabla 4.37. Datos de los pacientes pertenecientes al *cluster* del área III.

Trece de los 16 casos se conocían entre sí, la mayoría de ellos frecuentaba el mismo bar desde hacía varios años; uno de los pacientes, el caso índice, era el camarero del bar, había sido diagnosticado de tuberculosis en 2005, en la radiografía de tórax presentaba cavitaciones pulmonares bilaterales y era muy bacilífero.

2. Alerta recibida desde el Servicio de Medicina Preventiva del HUCA: Varios casos de tuberculosis diagnosticados en un corto periodo de tiempo, estaban implicados pacientes con patología crónica frecuentadores habituales de una misma unidad de hospitalización del HUCA. Se solicitó estudio molecular para identificar cadenas de transmisión. Resultado del estudio: se pudo confirmar que ninguno de los casos objeto de la alerta pertenecía a la misma cadena de transmisión; sin embargo, al revisar la totalidad de casos de tuberculosis en pacientes vinculados con la citada unidad de hospitalización, se identificó la existencia de un *cluster* que había pasado desapercibido con la metodología convencional, y que agrupaba a 4 pacientes que pertenecían a una misma cadena de transmisión, además se evidenció la existencia de transmisión intrahospitalaria.

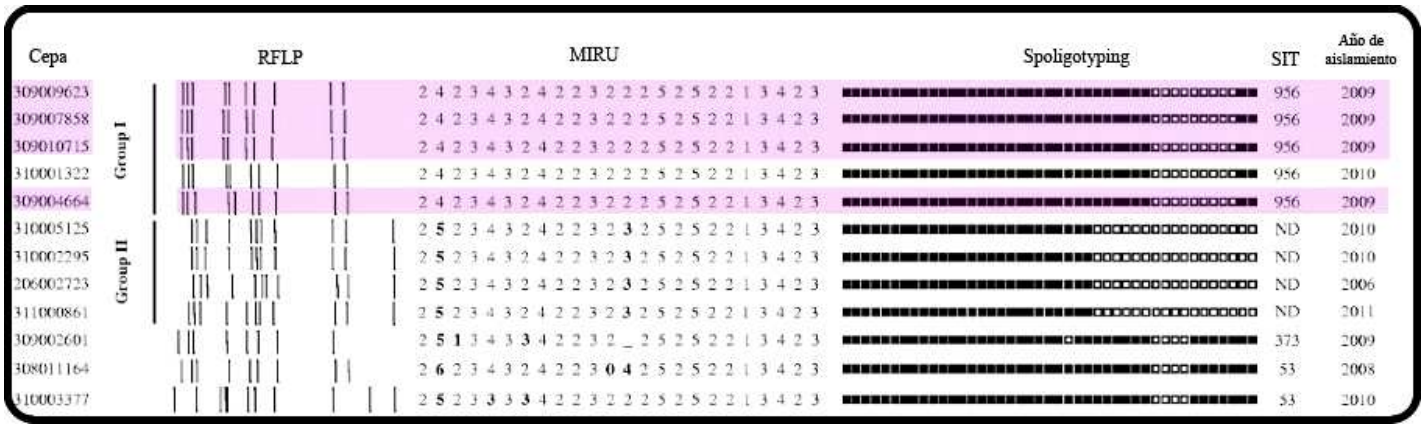


Fig. 4.24. Patrones de RFLP-IS6110, MIRU y *Spoligotyping*. Las diferencias en MIRU se indican en negrita.

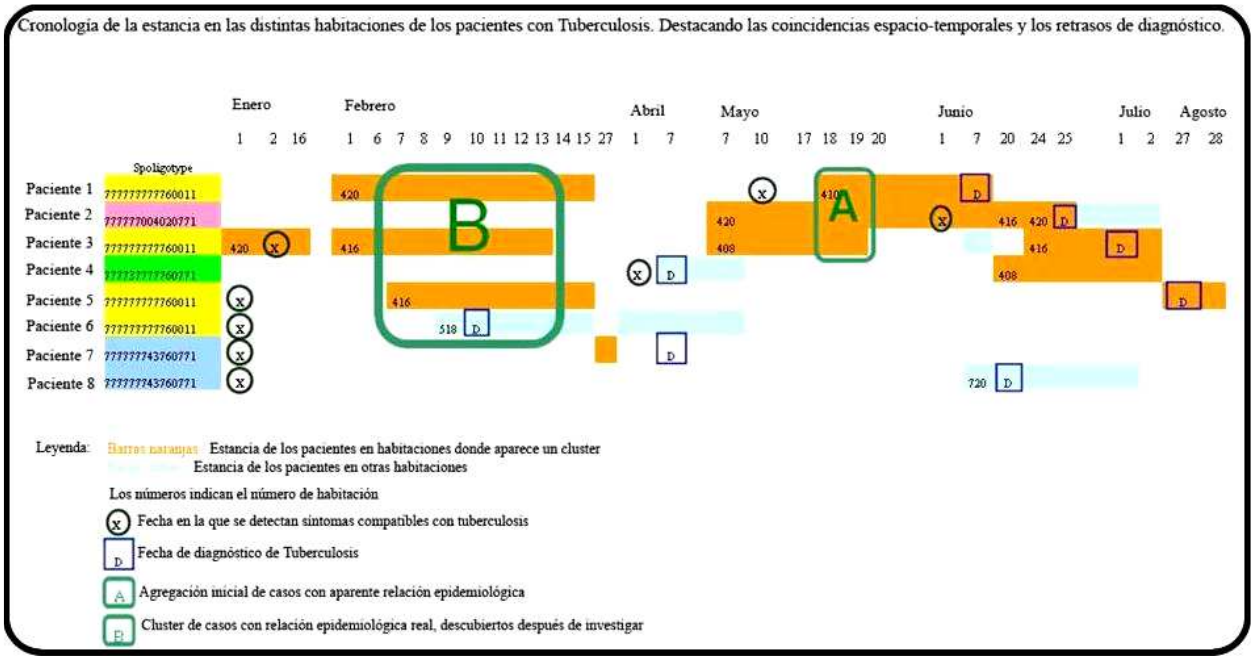


Fig. 4.25. Esquema que muestra la estancia de cada uno de los pacientes en las distintas habitaciones a lo largo del tiempo.

A posteriori, se confirmó que con los 4 pacientes se produjeron coincidencias espacio-temporales en la misma unidad de hospitalización, incluso en una misma habitación coincidieron de manera simultánea dos de ellos; asimismo, se evidenció una baja sospecha clínica y una excesiva demora diagnóstica.

3. Alerta recibida desde la Sección de Vigilancia Epidemiológica del Principado de Asturias: en un corto periodo de tiempo se diagnosticaron 3 casos de tuberculosis en personas vinculadas con un instituto de enseñanza secundaria: una trabajadora del centro; una alumna; y el abuelo de esta última. Se solicitó estudio molecular para identificar cadenas de transmisión.

1		776177400000171
2		757777607760771
3		777737557760771

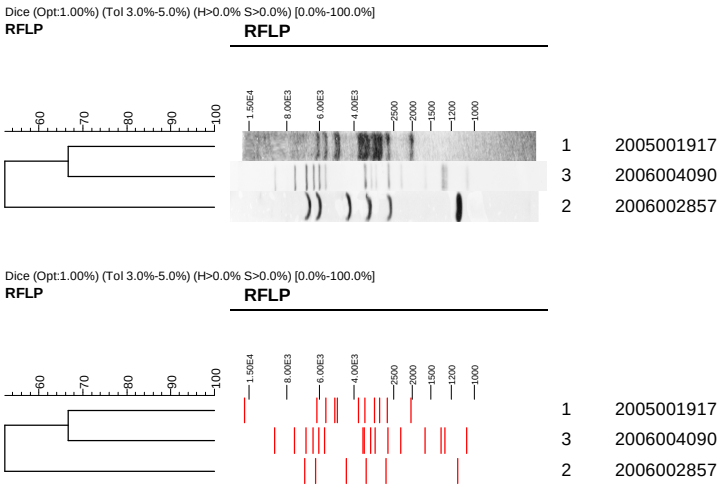


Fig. 4.26. Patrones de *Spoligotyping* y RFLP-IS6110 de pacientes implicados en la alerta en un instituto.

Se identificaron 3 patrones genéticos diferentes, se excluyó la pertenencia de los tres casos a la misma cadena de transmisión, se identificaron tres cadenas de transmisión. El abuelo y la nieta estaban involucrados en cadenas de transmisión diferentes.

4. Alerta recibida desde la Sección de Vigilancia Epidemiológica del Principado de Asturias: agregación de 7 casos de tuberculosis diagnosticados en una institución cerrada (Centro Penitenciario). Se solicita estudio molecular para identificar cadenas de transmisión.

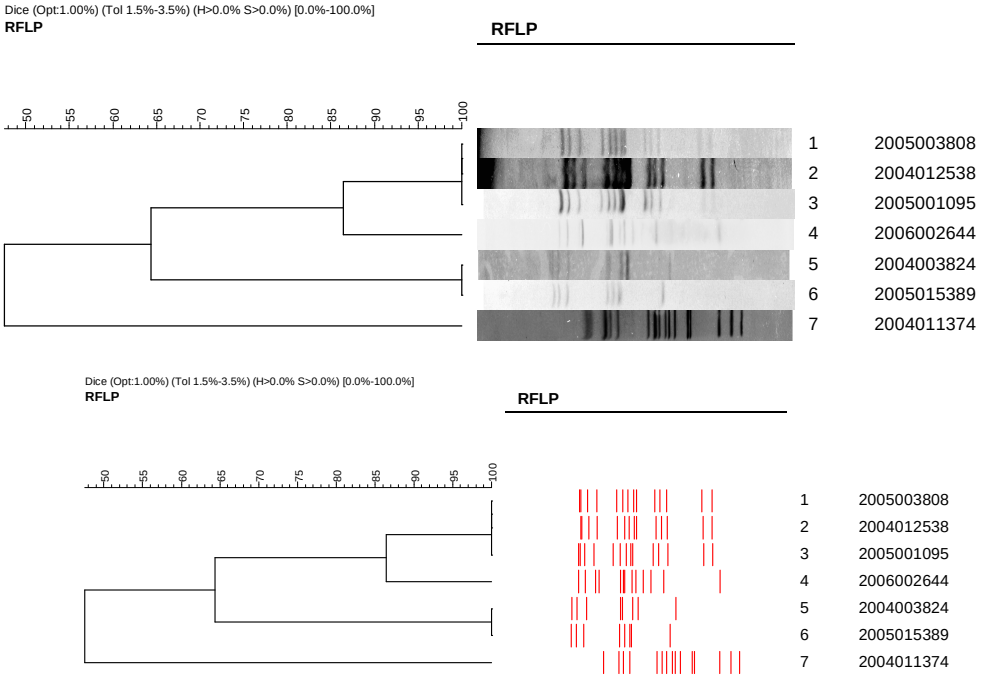


Fig. 4.27. Patrones de RFLP-IS6110 de pacientes pertenecientes al Centro Penitenciario.

Los 7 casos de tuberculosis motivo de la alerta habían sido diagnosticados entre el 17 de marzo de 2004 y el 1 de marzo de 2006. Por RFLP-IS6110 se identificaron cuatro cepas genéticamente diferentes. Lo que permitió descartar que todos los casos pertenecieran a una misma cadena de transmisión, y se evidenciaron cuatro cadenas de transmisión diferentes en una misma institución cerrada: Un *cluster* que agrupaba a 3 pacientes, otro a 2, y dos casos aislados sin relación con los demás, ni entre sí.

5. Reinfección *versus* Reactivación

Dos pacientes, padre e hijo, dos casos de tuberculosis coincidentes en el tiempo; pero para el hijo representa su segundo episodio de tuberculosis en cinco años (en 1997 y en 2002 respectivamente), por parte del Servicio de Neumología del HSA se solicitó estudio molecular ante la posibilidad de una reactivación tuberculosa y sus posibles repercusiones terapéuticas.

Hijo 1997		000000004020771
Hijo 2002 2º episodio TB		776170000000071
Padre 2002		776170000000071

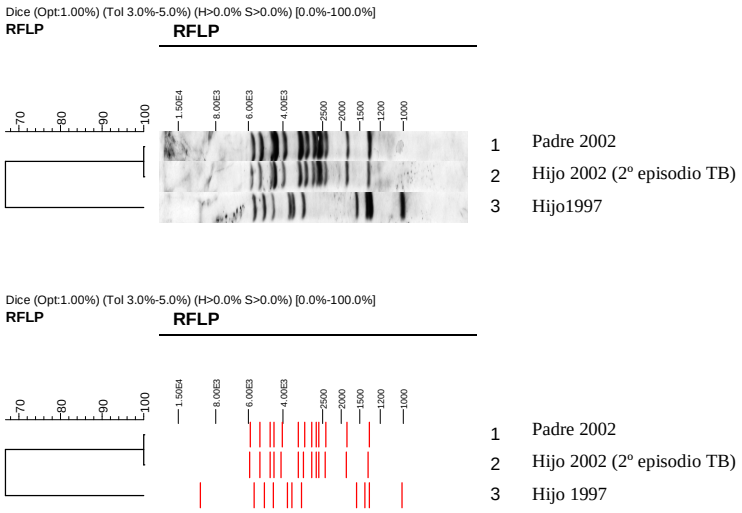


Fig. 4.28. Patrones de *Spoligotyping* y RFLP-IS6110 correspondientes a un ejemplo de reactivación/reinfección.

<u>Resultado del estudio:</u> los patrones genéticos identificados en las cepas de los dos episodios de tuberculosis del hijo son diferentes, se descarta reactivación y se confirma un episodio de reinfección tuberculosa.

6. Detección del Error intra-laboratorio

Tres muestras de pacientes diferentes, en los tres casos se aisla e identifica *M. tuberculosis*; las muestras habían sido procesadas el mismo día, una de las muestras correspondía a un paciente bacilífero con diagnóstico de tuberculosis (clínico y microbiológico, con varias muestras más positivas); las otras dos muestras pertenecían a dos pacientes sin clínica ni lesiones radiológicas concluyentes, el examen microscópico había sido negativo y era las únicas muestras positivas de una serie de tres.

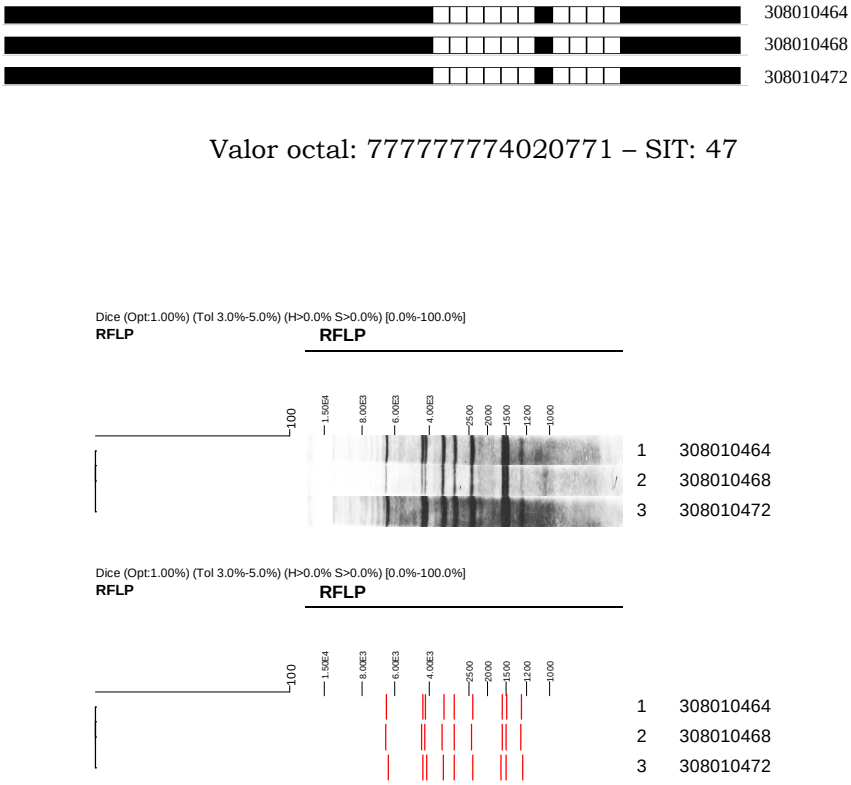
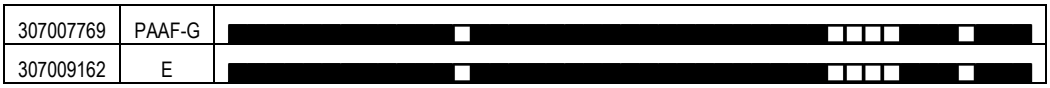


Fig. 4.29. Patrones de *Spoligotyping* y RFLP-IS6110.

Se identifican tres patrones genéticos idénticos que evidenciaron una contaminación cruzada entre las muestras

7. Un mismo paciente, dos localizaciones de la tuberculosis (pulmonar-ganglionar), 2 cepas, idéntico patrón genético por *Spoligotyping*, dos patrones diferentes pero "casi idénticos" (<1 banda) por RFLP-IS6110.



Valor Octal: 777737777760731 – SIT: 73

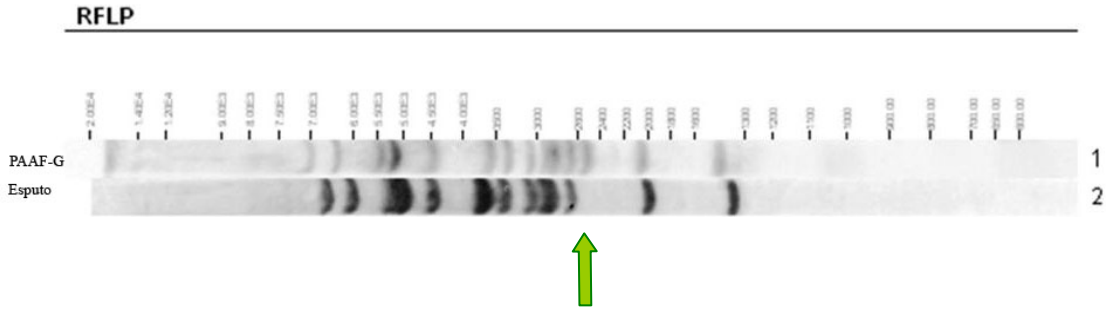


Fig. 4.30. Patrones de *Spoligotyping* y RFLP-IS6110.

Estos dos patrones son "patrones únicos" por ambas técnicas en la base de datos de genotipos de tuberculosis de Asturias 2004-2010.

8. Dos pacientes, padre e hija, dos casos de tuberculosis coincidentes en el tiempo, 2 cepas con idéntico patrón genético por *Spoligotyping*, dos patrones diferentes pero "casi idénticos" (<1 banda) por RFLP-IS6110.

Valor Octal: 775777766660771

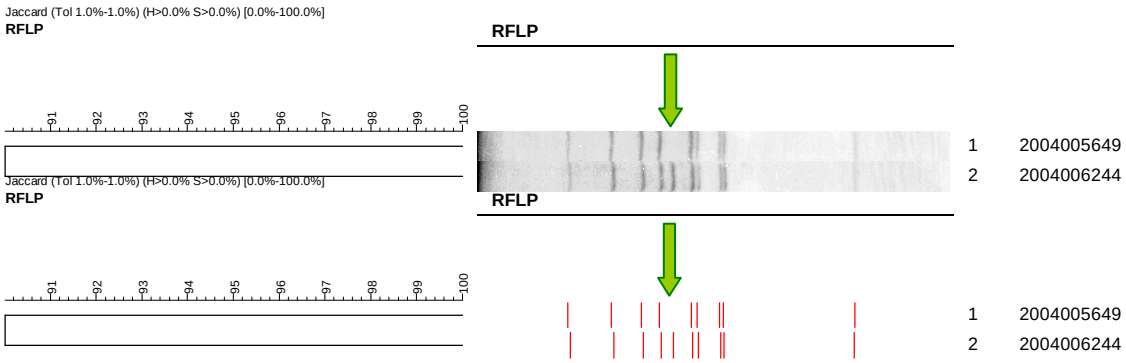


Fig. 4.31. Patrones de *Spoligotyping* y RFLP-IS6110.

Estos dos patrones son “patrones únicos” por ambas técnicas en la base de datos de genotipos de tuberculosis de Asturias 2004-2010.

9. Tres pacientes, una misma cadena de transmisión (evidenciada mediante estudio convencional de contactos), 3 cepas con idéntico patrón genético por *Spoligotyping*, dos cepas patrones genéticos idénticos por RFLP-IS6110 y una cepa diferente pero “casi idéntico” (>1 banda).

Valor Octal: 756177607760771

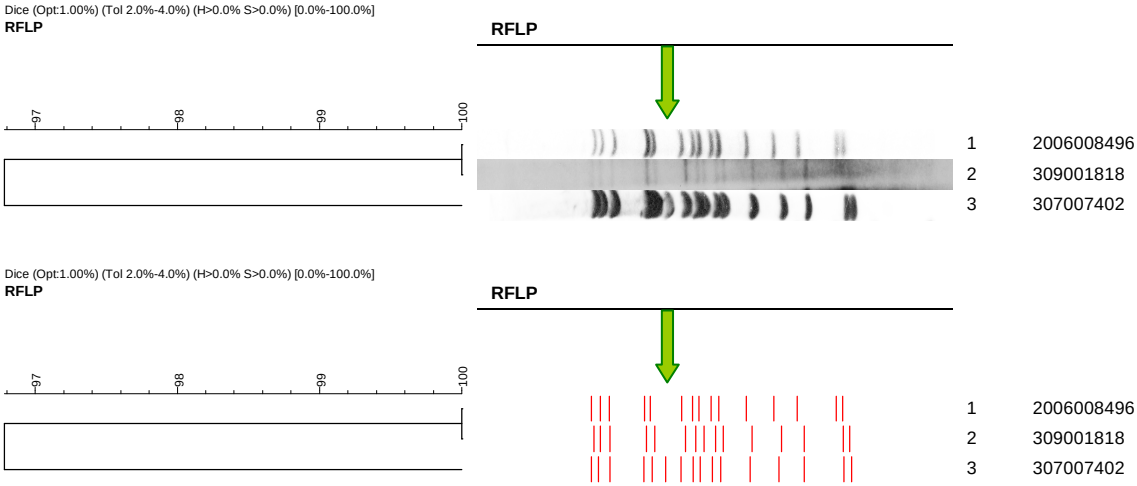


Fig. 4.32. Patrones de *Spoligotyping* y RFLP-IS6110.

Estos tres patrones son “patrones únicos” por ambas técnicas en la base de datos de genotipos de tuberculosis de Asturias 2004-2010.

5. Discusión

En Asturias, la tasa media de incidencia de tuberculosis de los últimos seis años y medio fue de 18 casos por 100.000 habitantes, lo que con respecto a la década de los 90, con tasas del orden de 40 a 50 casos por 100.000 habitantes, supone una reducción a más de la mitad. El ECDC, en su último informe *Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2012* [34], notifica una tasa media de incidencia de la tuberculosis en la UE de 14,6 casos por 100.000 habitantes en el año 2010; con un rango que iba desde los 4,3 casos por 100.000 en Grecia, hasta los 98,2 casos por 100.000 en Rumanía. España ocupaba el noveno lugar por casos de tuberculosis (15,4) tras Rumanía (98,2), Lituania (58,2), Letonia (41,5), Bulgaria (35), Estonia (24,5), Portugal (24,7), Polonia (19,7) y Hungría (17,4). Por lo que la tasa registrada en Asturias se sitúa cerca de la media tanto europea como española.

La tercera parte de los casos de tuberculosis (33,9%) se produjeron en pacientes con edades comprendidas en los tramos de edad que iban de los 75 a 84 años (17,4% de los casos) y de los 25 a 34 años (16,6% casos), conformando la típica curva de distribución bimodal. En nuestra región la tuberculosis todavía sigue afectando a un importante número de pacientes jóvenes, la cuarta parte de los casos (24,6%) tenía menos de 34 años, lo cual de manera indirecta pone en evidencia la existencia de transmisión reciente.

Asimismo, se han detectado cambios significativos en la distribución de los casos de tuberculosis por sexos; la proporción de 3/1 (hombres/mujeres) citada de manera reiterada en la literatura como habitual, solamente se evidenció en el rango de edad comprendido entre 45 y 84 años (55,1% de los casos). Sin embargo, por debajo de los 45 años la proporción hombre/mujer se igualaba, siendo de 1,4/1 en el rango de 0 a 34 años (24,6% de los casos), e incluso menor (1,1/1) entre los menores de 24 años (8% de los casos).

Tres áreas sanitarias (III, IV y V), a su vez las más pobladas (73,1% de la población asturiana), aglutinaban el 77,6 % del total de casos de tuberculosis (974 pacientes). Las tasas de incidencia más elevadas se registraron principalmente en las áreas urbanas-industriales; mientras que dos áreas, con un mayor impacto agrícola-ganadero, presentaron las más bajas (áreas I y VI). El área IV presentó la mayor tasa de incidencia (20,1) y el área VI la menor (5,6).

Como cabría esperar, la mayoría de las tuberculosis eran de origen respiratorio (78,9%), y *M. tuberculosis* subespecie hominis la especie más frecuentemente identificada, representando un 98,2% (1233 cepas). El 94,1% de las cepas de *M. tuberculosis* complex aisladas en nuestra región eran sensibles a todas las drogas de primera línea más etambutol y estreptomicina, mientras que el 5,9% presentaban alguna resistencia (primaria + secundaria) a dichos fármacos. En cuanto al porcentaje de resistencias a isoniacida (3,1%); rifampicina (0,5%); y pirazinamida (1,9%); están por debajo de los límites considerados de riesgo. El impacto de las cepas MDR-TB y XDR-TB durante el periodo 2004-2010 fue inferior al 0,5%. La situación de las resistencias en Asturias avala la vigencia, en nuestro medio, de las pautas de tratamiento empírico inicial con tres fármacos en los pacientes autóctonos sin factores de riesgo añadidos. Se debe tener presente que en nuestra región se llevan a cabo, de manera sistemática, pruebas de sensibilidad a todos los aislamientos de *M. tuberculosis* complex.

Las dos técnicas de genotipificación empleadas (*Spoligotyping* y RFLP-IS6110) nos han permitido constatar una gran variedad de genotipos de *M. tuberculosis* "circulantes" en nuestra región (281 *vs* 913). El RFLP-IS6110 está considerada como la técnica más discriminativa y el patrón oro.

La tasa de agrupamiento detectada mediante *Spoligotyping* fue del 86,3% frente al 39,3% por RFLP-IS6110. En el caso del *Spoligotyping* la tasa se aleja de las que aparecen publicadas en países con baja prevalencia de tuberculosis, y se aproxima más a las descritas en otros lugares como Taipei (82%), Acapulco (77,9%) o Teheran (74,4%) [27, 36, 74]; sin embargo en el caso del RFLP-IS6110 la cifra es comparable a la encontrada en ciudades como Sevilla (38%), Zaragoza (39,4%), Hamburgo (33,7%) o Milán (41%) [23, 72, 88, 89]. Otros muchos estudios recogen tasas de agrupamiento superiores, como es el caso de Madrid (50,7%), Elche (52,4%) o Portugal (60,7%) [38, 51, 85]; y también inferiores, como es el caso de Noruega (22,3%) [21]. Ante la más que evidente disparidad de resultados publicados, convendría hacer hincapié en que en nuestro estudio se incluyeron la totalidad de aislamientos de *M. tuberculosis* de toda una región durante un periodo de seis años y medio; mientras que en la mayoría de trabajos publicados no se incluyen la totalidad de cepas aisladas sino que se basan en muestreos selectivos (a veces una sola ciudad de toda una región, a veces un solo distrito de una gran ciudad) por lo que los resultados globales publicados muchas veces son simples extrapolaciones.

Las agrupaciones (*clusters*) más frecuentes fueron las integradas por 2 y 3 cepas, hecho constatado con ambas técnicas, lo que, en conjunto, suponía el 57,6% del total de agrupamientos por *Spoligotyping*, y el 85,7% del total de agrupamientos por RFLP-IS6110. Con independencia de las diferencias numéricas encontradas entre las dos técnicas, existe una concordancia con lo que se describe en la mayoría de estudios publicados en los que también encuentran que los *clusters* de menos de 5 cepas suponen más del 50 por ciento del total de agrupamientos detectados.

El resto de *clusters* eran muy heterogéneos en su composición, llegando a superarse en dos de ellos el centenar de cepas agrupadas por *Spoligotyping*; mientras que el *cluster* más numeroso detectado por RFLP-IS6110 estaba formado por 15 cepas.

En lo referente a la distribución de los *clusters* por la geografía asturiana, había unos *clusters* que incluían cepas aisladas en dos o más áreas sanitarias del Principado de Asturias (los denominamos: *clusters* mixtos) representaban el 72% por *Spoligotyping* y el 77,2% por RFLP-IS6110; mientras que otros *clusters* estaban formados por cepas cuyo aislamiento se circunscribía a un área sanitaria concreta (los denominamos: *clusters* "exclusivos", la mayoría estaban formados por 2 ó 3 cepas) suponían un 28% en el caso del *Spoligotyping* y un 22,7% en el caso del RFLP-IS6110. Todos los *clusters* de más de 5 cepas, por cualquiera de las dos técnicas, eran mixtos. El Área IV presentaba por ambas técnicas la tasa de agrupamiento más alta (75% *Spoligotyping*; 41,4% RFLP-IS6110); y el Área VI la más baja (31,2% *Spoligotyping*; 0% RFLP-IS6110). Asimismo, en el área IV también se localizaba el mayor número de *clusters* "exclusivos".

Mediante RFLP-IS6110 se identificaron un total de seis *clusters* formados por más de 10 cepas, en ellos estaban representadas cepas aisladas en cuatro de las cinco áreas sanitarias del Principado con mayor impacto urbano-industrial (III, IV, V, VIII); llamando poderosamente la atención que en ninguno de esos *clusters* hubiera cepas de pacientes pertenecientes al área VII, que cuenta con una población de más de 71.000 habitantes y con una localización geográfica y unas comunicaciones que propician los movimientos de las personas. Eso unido a que resulta igualmente llamativo que la tasa de agrupamiento registrada en esa área por RFLP-IS6110 sea del 4,4 %, muy inferior a la de otras zonas úrbanas-industriales de Asturias que se mueven en una horquilla del 25,5 al 41,4%.

En cuanto al impacto de los "patrones huérfanos" o "patrones únicos", en nuestra región representan un 13,5 por *Spoligotyping* frente a un 54,6% por RFLP-IS6110. Como era de esperar, los patrones "huérfanos" fueron mucho más frecuentes entre los mayores de 65 años (43,1% *Spoligotyping*; 39,7% RFLP-IS6110) que entre los menores de 34 años (16% *Spoligotyping*; 20,5% RFLP-IS6110). Estos datos refuerzan la hipótesis de que la presencia de patrones "huérfanos" es mayor entre las cepas aisladas de los pacientes de más edad, debido a que probablemente sean reactivaciones endógenas de infecciones adquiridas en el pasado. En el polo opuesto estarían en los menores de 34 años, el hecho de encontrar entre ellos menos patrones "huérfanos" demuestra que mayoritariamente desarrollan la enfermedad a partir de cadenas de transmisión reciente. Además, conviene resaltar que en el caso de los jóvenes, una parte de los patrones huérfanos guardaba relación directa con población inmigrante residente en Asturias, y se reflejaba en la identificación por *Spoligotyping* de patrones genéticos no habituales en nuestro medio pero que son prevalentes en otros países.

En cualquier caso, las herramientas moleculares han puesto de manifiesto que la inmensa mayoría de los casos de tuberculosis en población joven en Asturias provienen de cadenas de transmisión reciente; y que en el caso de la población inmigrante nos permiten, además, diferenciar aquellos casos de tuberculosis debidos a cepas autócnonas (el paciente se infecta y enferma aquí), de los casos debidos a cepas importadas (el paciente ya había sido infectado, o bien llega enfermo, desde su lugar de procedencia).

En el caso del *Spoligotyping*, la existencia de una base de datos internacional como SpolDB4 nos ha permitido conocer la distribución a nivel mundial de los patrones genéticos identificados en Asturias. Así pudimos comprobar que los patrones genéticos más prevalentes entre las cepas de nuestra región son también los más extendidos en el resto del mundo.

El *cluster* **Lam09** mayoritario en nuestra región (109 cepas) incluye 1930 cepas en la base de datos internacional. El segundo *cluster* más numeroso de Asturias **T1** (100 cepas) es también el que figura como más ampliamente distribuido por España (153 cepas registradas en la base de datos). En cambio, algunas de nuestras cepas más prevalentes no lo son tanto en otros países, como es el caso del *cluster* **LAM 3** formado por 86 cepas se corresponde con un patrón del que hay registradas 609 cepas en todo el mundo y solamente 23 en otras zonas de España; o el **SIT 58** (85 cepas) que cuenta con más presencia en Asturias que en todo el resto del mundo (76 cepas).

No hemos encontrado una uniformidad en lo que podríamos denominar dinámicas, o cadencias, en cuanto a la frecuencia de aislamientos a lo largo del tiempo de las diferentes cepas por nuestra región. Sin embargo, sí pudimos constatar la presencia de cepas emergentes, aquellas que en los primeros años sus genotipos no aparecían representados y que, una vez producida su irrupción, se expandían de manera progresiva. Otras cepas, después de una irrupción más o menos brusca, luego no iba seguida de una expansión progresiva, pudiendo incluso apreciarse un retroceso paulatino. Asimismo, observamos que en nuestra región había cepas prevalentes, su número aumentaba y disminuía de manera alterna sin definirse claramente una tendencia.

Tampoco sabemos los motivos últimos por los cuáles unos *clusters* son minoritarios y otros masivos. Se podría especular con que los *clusters* grandes quizá aglutinen cepas que lleven más tiempo diseminándose por nuestra región, pero en tal caso se esperaría encontrar una mayor presencia de estos *clusters* en grupos de edad avanzada, cosa que no se ha evidenciado.

Otras posibilidades serían que se trate de cepas más virulentas o mejor adaptadas a nuestro medio, o bien que los hospedadores sean especialmente susceptibles; pero todos estos aspectos exceden los límites marcados para nuestro estudio.

Para el cálculo de las tasas de agrupamiento en diferentes contextos decidimos acotar el tramo intermedio de nuestro estudio, con un margen de exclusión de dos años en un intento de captar las cepas más representativas de cara a la identificación de tendencias, ya que el 5-10% de los nuevos expuestos-infectados que desarrollan enfermedad lo hacen a lo largo de los dos primeros años tras la infección.

La tasa de agrupamiento en las cepas aisladas en hombres y en mujeres, respecto al total de cepas fue similar (80% y 79,3% *Spoligotyping*; 35,1% y 36,3% RFLP-IS6110, respectivamente); aunque las cepas aisladas en los hombres presentaban una tasa de agrupamiento entre sí ligeramente superior a las de las cepas aisladas en mujeres entre ellas (77,6% *vs* 66,2% por *Spoligotyping*; 26,3% *vs* 17,2% por RFLP-IS6110).

Analizando los resultados por rangos de edad se observó que las cepas aisladas en los menores de 14 años presentaban las mayores tasas de agrupamiento indistintamente por ambas técnicas (100% *Spoligotyping*; 60% RFLP-IS6110), lo que se correlaciona con transmisión reciente. Por el contrario, las cepas recuperadas de los mayores 85 años (en el caso del *Spoligotyping*); y con edades comprendidas entre 65 y 74 años (en el caso del RFLP-IS6110), presentaban la tasa de agrupamiento más baja (64,5% y 24,6% respectivamente) lo que habla a favor de episodios de tuberculosis por reactivación endógena de infecciones adquiridas en el pasado.

La mayoría de los estudios considera la edad como un factor de riesgo para pertenecer a un *cluster*, aunque en otros trabajos lo desvinculan. Algunos autores apuntan que la tasa de agrupamiento desciende con la edad y sitúan las mayores tasas de agrupamiento entre los 40 y 44 años.

En nuestro estudio, las mayores tasas de agrupamiento por rangos de edad entre sí se registraron, en el caso del *Spoligotyping* en el de 35-44 años (79,2%) seguido del de 25-34 años (72,3%); y en el caso del RFLP-IS6110, aunque la tasa mayor se encontró en el rango de 0-14 años (40%), en conjunto, todas las tasas en los tramos de edad inferiores a 44 años eran más elevadas que en los tramos de edad de 45 o más años. Se podría especular con que estas elevadas tasas de agrupamiento en edades medias de la vida sean una consecuencia de los hábitos sociales actuales. Entre los 25 y los 44 años las interacciones entre las personas suelen ser más frecuentes y más diversas; los jóvenes a menudo interactúan más que un niño o un anciano. En un estudio en EEUU [31] se observó que las conductas sociales actuales llevan a interaccionar con un gran número de personas al día, lo que diversifica mucho las fuentes de exposición a diferentes patógenos y no las restringe exclusivamente a los contactos personales más cercanos. El citado estudio abarcaba el periodo 1996-2000 y demuestra que un 50,9% se habían infectado por vías consideradas tradicionales (vivir en la misma casa, familiares cercanos, pareja, amigos cercanos, etc.), pero en un 49,1% de personas la infección había sido adquirida por otras vías (hospitales, albergues, bares, lugar de trabajo, etc.). Los hábitos sociales actuales, en particular los relacionados con ambientes que conllevan una gran afluencia de personas, deberían ser tenidos siempre en cuenta a la hora de analizar posibles fuentes de contagio de tuberculosis.

Las herramientas moleculares en estos contextos permiten revelar vínculos que de otra manera podrían pasar desapercibidos con la metodología convencional.

El análisis de los patrones según el origen de la muestra, y con respecto a la totalidad de cepas, en el caso del *Spoligotyping* no evidenció diferencias significativas entre las cepas aisladas de muestras de origen respiratorio y extra-respiratorio (80% y 78,6% respectivamente); pero, cuando se comparaban entre sí, se observaba un porcentaje de agrupamiento ligeramente superior entre las cepas aisladas de muestras respiratorias (77,4% y 68,7% respectivamente). En cuanto al RFLP-IS6110, el agrupamiento en las cepas de origen pulmonar fue claramente superior al de las de origen extra-respiratorio (34% *vs.* 20%).

Por lo que se refiere a la baciloscopia, el agrupamiento detectado por *Spoligotyping* fue ligeramente superior en las cepas aisladas de muestras con baciloscopias negativas (86,5%) frente a las aisladas en muestras con baciloscopias positivas (76,1%) lo cual resulta llamativo. Pero en el caso del RFLP-IS6110 se observó justo lo contrario, las cepas de muestras con baciloscopias positiva se agrupaban más que las recuperadas de muestras con examen microscópico negativo, tanto respecto al total de casos como entre sí (34,5 vs 26,6; y 13,1 *vs* 4,2%, respectivamente); los datos del RFLP-IS6110 son coincidentes con los de otros estudios publicados.

Las herramientas moleculares permitieron objetivar que, en tres de cada cuatro casos de tuberculosis extrapulmonar, se identificaron cepas circulantes, de origen pulmonar, con los mismos patrones genéticos, por lo que es más que probable que algunas de estas cepas fueran las probables fuentes del contagio.

Todo lo comentado vuelve a incidir en el hecho de la existencia de un importante grado de transmisión reciente de tuberculosis en nuestro medio, y de que aportamos pruebas "objetivas" que lo corroboran.

Pero siendo realistas, creemos que las cadenas de transmisión reciente evidenciadas solamente podrán ser combatidas de manera efectiva implicando a las autoridades sanitarias, para que hagan posible la existencia de equipos multidisciplinares en la lucha contra la tuberculosis; y alentando el trabajo coordinado de todos los profesionales sanitarios.

El hecho de que algunas especies incluidas en el taxón *M. tuberculosis* complex presenten un patrón característico por *Spoligotyping* permite su identificación a nivel de especie sin necesidad de recurrir a otros métodos. Este es el caso de la especie *M. bovis* que se caracterizan por la ausencia en todas las cepas de los espaciadores 3, 9, 16, 39, 40, 41, 42 y 43; la presencia o ausencia de otros espaciadores permite la diferenciación entre todas las cepas de esa especie. Durante el periodo de estudio se identificaron 16 *M. bovis* a partir de muestras clínicas de 16 pacientes (edad media 61 años) 13 hombres y 3 mujeres. Llama la atención el hecho de que la mayoría de casos fueran tuberculosis pulmonares (62,5%), algunas incluso con baciloscopia positiva; en el resto de casos el aislamiento se produjo a partir de muestras de biopsias ganglionares, de colon y líquido peritoneal. Aunque los casos de tuberculosis originados por esta especie suelen tener vínculos estrechos con el medio rural, y sobretodo ganadero, 13 de los 16 casos fueron diagnosticados en las áreas IV y V, con una población mayoritariamente urbana; aunque desconocemos los contextos personales y laborales, así como los posibles factores de riesgo de la mayoría de los pacientes.

Entre las 16 cepas se identificaron 9 patrones diferentes entre sí por *Spoligotyping* desglosados en 3 *clusters* formados por 5, 3, y 2 cepas respectivamente; lo que representa un agrupamiento del 62,5%; las 6 cepas restantes presentaban patrones "huérfanos". En colaboración con el Laboratorio de Sanidad Animal de Jove (que es el encargado de diagnosticar en el Principado de Asturias los casos de tuberculosis por *M. bovis* en animales, y con el Centro de Vigilancia Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (VISAVET) se cotejaron los patrones de las 9 cepas aisladas en humanos (16 pacientes) con los patrones existentes en sus bases de datos de origen animal. Siete de los 9 patrones identificados en humanos estaban representados entre los casos de origen animal aislados en Asturias, y 2 en casos aislados en otras regiones del territorio español. Este hallazgo tal vez no resulte muy sorprendente en el ámbito de una zoonosis, pero teniendo en cuenta que el primer caso de *M. bovis* con genotipo disponible se identificó en 2006, y que desde entonces se haya mantenido constante un número de 3-4 casos por año; esto último ya resulta mucho más llamativo, sobre todo porque Asturias cuenta con una cabaña oficialmente saneada. Por ello creemos que sería aconsejable, y en tal sentido se informó a la autoridad sanitaria, que la información disponible a partir del *Spoligotyping* fuera empleada para llevar a cabo estudios convencionales que aportaran información de los casos humanos y de la existencia, o no, de vínculos con los focos de infección de origen animal, todo ello sin excluir la posibilidad, ya recogida en la literatura, de la posible transmisión de *M. bovis* directamente entre humanos [35, 94]. En lo referente a los patrones genéticos de *M. bovis* obtenidos por RFLP-IS6110, indicar que esta técnica no resulta útil para realizar estudios comparativos entre cepas debido a que esta especie suele tener en su genoma solamente 1 ó 2 copias de IS6110 lo que se sitúa por debajo de los límites de discriminación considerados como adecuados (>6 copias).

Asimismo, con nuestro estudio pudimos documentar cuatro casos de tuberculosis debidas a cepas de *M. africanum*, recuperadas de tres hombres y una mujer con edades comprendidas entre los 24 y 55 años.

Como dato anecdótico, indicar que la primera cepa de M. *africanum* se aisló en Abril del 2008 en un paciente español, sin antecedentes conocidos de viajes al exterior, pero frecuentador habitual de albergues de acogida donde convivía con personas de otras nacionalidades. En los tres casos restantes se trataba de inmigrantes procedentes de Senegal y de Guinea Ecuatorial que llevaban residiendo en España entre 9 meses y 3 años. El *Spoligotyping* y el RFLP-IS6110 permitieron demostrar que los patrones genéticos de las cuatro cepas eran diferentes entre sí, descartando cualquier relación epidemiológica entre ellos; que al menos tres de los cuatro casos eran importados; y que, a pesar de que los cuatro pacientes eran bacilíferos, hasta la fecha no se ha detectado ningún caso secundario.

La demostración por *Spoligotyping* de la presencia en Asturias de cepas del genotipo Beijing sirve, una vez más, para corroborar la amplia distribución mundial de esta familia de genotipos (4051 cepas registradas en SpolDB4, segunda entrada más importante). Su característico patrón genético, presencia exclusivamente de los espaciadores 35 al 43 y ausencia del resto, la hacen fácilmente identificable por esta técnica de genotipificación. La familia Beijing se caracteriza por su elevado grado de transmisibilidad y por presentar a menudo resistencia. En Asturias el primer caso se remonta al año 2006, en total se han diagnosticado cuatro casos: un caso en una mujer española de 83 años de la que no se conocen datos sobre posibles viajes a zonas endémicas; y tres casos más en población inmigrante procedente de Rumanía, Uruguay y China respectivamente.

La presencia en Asturias de estas cepas de momento sigue siendo anecdótica (1,8%), baja presencia que contrasta con la otros países como China, donde es el genotipo predominante (79 - 92%); las tasas encontradas en nuestra región se asemejan más a las estimadas en Latinoamérica (1 al 10%) o en Estados Unidos (0,02 al 27%). El *Spoligotyping* no permite diferenciar entre sí cepas del genotipo Beijing, para ello debe recurrirse al RFLP-IS6110 o al MIRU-VNTR. En el caso de las cepas aisladas en Asturias, el RFLP-IS6110 permitió evidenciar que las cuatro eran diferentes entre sí, y se revelaban diferentes cadenas de transmisión. Solamente una de las cepas Beijing era MDR-TB; otra presentaba polirresistencias; y las dos restantes eran sensibles a todos los fármacos de primera y segunda línea.

En lo que se refiere a las 7 cepas MDR-TB aisladas en Asturias (una de las cuales era además XDR-TB), conviene destacar que tanto el *Spoligotyping* como el RFLP-IS6110 demostraron que todas ellas eran diferentes entre sí, por lo que se podía asegurar que no guardaban vínculo epidemiológico alguno entre ellas. Cuatro de las cepas MDR-TB eran "patrones huérfanos" en Asturias, y las tres restantes aunque formaban parte de diferentes *clusters*, las cepas con las que compartían genotipo no exhibían multirresistencia en el antibiograma.

La utilización sistemática de dos herramientas con diferente poder discriminatorio para la genotipificación de cepas de *M. tuberculosis* complex, creemos que nos ha permitido por una parte confirmar en nuestro medio algunos hallazgos que ya han sido observados en otros lugares con cada una de ellas; y, a la vez, disponer de una doble perspectiva a la hora de analizar los resultados obtenidos. La coincidencia absoluta entre las dos técnicas a la hora de confirmar o descartar la existencia de un agrupamiento se produjo solamente en una parte de las cepas analizadas (19,5%). Por otro lado, se identificaron *clusters* muy numerosos por *Spoligotyping* que se "fragmentaban" en una diversidad de patrones por RFLP-IS6110.

También es destacable que en más de la mitad de los *clusters* de 2 ó 3 cepas (los más numerosos, y en los que quizá se esperaría encontrar una mayor coincidencia) no se observaban concordancias entre *Spoligotyping* y RFLP-IS6110. De una manera pragmática, pero a nuestro modo de ver simplista, podría pensarse que es lo que cabría esperar, puesto que el poder discriminatorio de una herramienta es superior al de la otra. Sin embargo, hemos encontrado algunos casos significativos que deberían ser tenidos en cuenta a la hora de la comparación de resultados entre técnicas, y que van más allá de la coincidencia o de la discrepandia entendidas de acuerdo a criterios absolutos. Ciertamente, cuando la genotipificación de dos cepas (igualdad *vs* diferencia) es concordante por ambas técnicas, creemos que los resultados obtenidos en diferentes contextos se ven reforzados. Las dudas aparecen a la hora de interpretar aquellos casos en los que ambas cepas presentan el mismo patrón de *Spoligotyping* pero se observan "ligeras diferencias" entre los patrones por RFLP-IS6110 (misma distribución de bandas pero con ± 1 ó 2 bandas), reconocidas en la literatura como patrones "casi-idénticos" [60, 61]. Estas situaciones las hemos encontrado entre familiares con episodios de tuberculosis coincidentes en el tiempo, en los que además de evidenciarse vínculos epidemiológicos convencionales, los patrones obtenidos por RFLP-IS6110 eran "casi-idénticos" entre sí y, a la vez, eran patrones que no estaban presentes en nuestra base de datos de *Spoligotyping*. Este tipo de hallazgos en ciertas ocasiones se observan también en un mismo paciente; en concreto en casos de tuberculosis miliar y/o pulmonar-ganglionar, en los cuales los patrones de las cepas aisladas en diferentes órganos compartían un mismo patrón por *Spoligotyping* pero diferían ligeramente en el patrón de bandas por RFLP-IS6110 (patrones "casi-idénticos").

Eventos como los descritos aparecen recogidos en la literatura en el contexto de infecciones policlonales (infecciones mixtas por más de una cepa), e incluso, en algunos casos, se ha demostrado la existencia de la denominada compartimentalización de la tuberculosis (en un mismo paciente con una infección policlonal se evidenciaba una diseminación "selectiva" de algunas cepas a determinados órganos, mientras que otras se limitaban al aparato respiratorio [3, 40, 67, 75].

En lo que se refiere a los resultados obtenidos mediante RFLP-IS6110, conviene tener presente que con esta técnica la interpretación es más compleja, y en ocasiones subjetiva, que con el *Spoligotyping* (que tiene reconocido un óptimo potencial de comparación inter e intra-laboratorio y una excelente reproducibilidad). El *software* utilizado para comparar los patrones de bandas obtenidos mediante RFLP-IS6110 (*Fingerprinting Informatix* 3.0) compara simultáneamente el número de copias de la secuencia IS6110 y el peso molecular de las mismas, de una determinada cepa en relación a otra. La variabilidad inter-experimento y la baja reproducibilidad hacen necesario el empleo sistemático de marcadores de peso molecular y/o cepas de referencia en cada prueba que nos permitan asignar los correspondientes pesos moleculares a las bandas obtenidas con cada cepa; y, además, de cara a la inter-comparación de patrones en diferentes experimentos debemos fijar, manualmente, unos límites de optimización y tolerancia que permitan la comparación entre cepas de una manera lo más fidedigna posible. Los parámetros del *software* que mejor se ajustaron a la comparación visual fueron: Optimización 1%; Tolerancia 2%. Valores inferiores desagrupaban cepas visualmente iguales y, al contrario, valores superiores agrupaban cepas que a simple vista eran diferentes.

En cualquier caso, consideramos imprescindible que, una vez detectados los *clusters* con la herramienta informática, las asignaciones siempre deberían de ser revisadas y validadas visualmente.

El poder discriminativo guarda relación con el número de copias de IS6110 que presenta una cepa, en la literatura se considera que por encima de 6 copias el poder discriminatorio de la técnica RFLP-IS6110 resulta óptimo. En nuestro caso ampliamos ese límite a 8 copias, y comprobamos que el 80% de nuestras cepas tenían 8 o más copias de IS6110, con una media de copias por cepa igual a 10,3 ± 3.

A la luz de los resultados de nuestro estudio nos parece oportuno plantear nuevas interrogantes; la diferencia que en algunas ocasiones hemos observado entre dos cepas (iguales por *Spoligotyping* y diferentes, pero "casi-idénticas", por RFLP-IS6110) no debería ser explicada únicamente "de manera restrictiva" en un contexto de estabilidad reconocida de los patrones observados por *Spoligotyping* (recomendable para llevar a cabo estudios filogenéticos), y en un mayor poder discriminatorio del RFLP-IS6110, que es además el patrón oro. Cuando estas situaciones se encuentran en cepas aisladas de diferentes pacientes, probablemente nos decantaríamos por pensar en una posible explicación en el contexto de un escenario divergente: hablaríamos de dos cepas que serían adquiridas de manera independiente y para las que existiría un ancestro común (reflejado en un patrón coincidente por *Spoligotyping*), por lo que estaríamos ante un simple fenómeno evolutivo de alguna de las cepas (reflejado en ligeras diferencias en el patrón observado por RFLP-IS6110); sin embargo, en un buen número de casos identificados en Asturias tenemos constancia de la inexistencia en nuestra base de datos de *Spoligotyping* de otros patrones iguales que hubieran sido identificados con anterioridad en otros pacientes; lo que unido a la coincidencia temporal de los nuevos casos, coincidentes por *Spoligotyping* y discrepantes por RFLP-IS6110, hace que ese escenario no sea el más probable para muchos de nuestros casos.

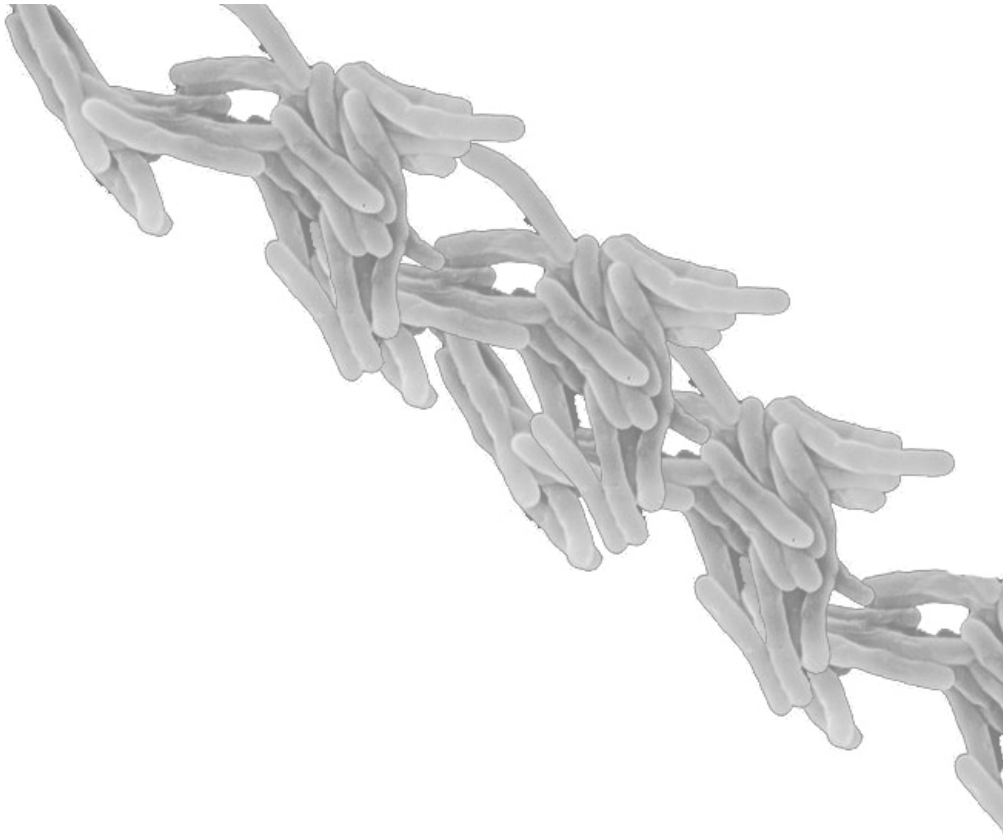
Cuando las situaciones descritas afectan a un mismo paciente podríamos pensar en un escenario convergente: se trataría de una infección mixta y de posibles casos de compartimentalización; sin embargo en algunos de nuestros casos se realizó MIRU-VNTR por lo que pudo descartarse la existencia de policlonalidad [6]. En cualquier caso, nuevos estudios basados en la secuenciación del genoma completo de *M. tuberculosis* que están siendo llevados a cabo en la actualidad tal vez nos permitan despejar muchas de estas interrogantes en un futuro no muy lejano.

Consideramos que la combinación de dos técnicas de genotipificación permite rentabilizar la información obtenida. Aporta claras respuestas en los casos de coincidencia, y en las discrepancias permite considerar otras posibilidades. En cualquier caso es obvio que el estudio epidemiológico convencional resulta imprescindible a la hora de establecer vínculos entre pacientes, pero también sabemos que como herramienta aislada no es totalmente eficaz; como se demuestra en los casos "vinculados molecularmente" que hemos identificado en personas sin relación aparente detectable con métodos convencionales. Pero a su vez, también opinamos que una estrategia de genotipificación que no vaya ligada a una investigación convencional no redundará en beneficios para el control y prevención de la tuberculosis en Asturias. Sirva de ejemplo el mayor *cluster* detectado por RFLP-IS6110 en nuestro estudio y que estaba formado por 15 cepas (16 por *Spoligotyping*). Hubo una Alerta Sanitaria abierta por parte de la Sección de Vigilancia Epidemiológica del Principado de Asturias a propósito de 5 casos de tuberculosis diagnosticados en una determinada ciudad en el año 2008; se trataba de pacientes jóvenes que se conocían entre sí.

Con los métodos moleculares se confirmó el agrupamiento de cepas, así como que había más casos implicados, lo que llevó a ampliar las encuestas convencionales, pero ahora "dirigidas" por la herramienta molecular, todo lo cual permitió localizar un nexo común: un lugar de

ocio compartido (un determinado bar, lugar habitual de reunión desde hacía unos años); y un caso índice que no era ninguno de los pacientes citados en la alerta; se trataba de uno de los camareros del bar que había sido diagnosticado y tratado de tuberculosis tres años antes (2005) pero que en la actualidad estaba curado; asimismo, se pudo comprobar que había más casos intermedios a lo largo de los años 2006 y 2007. El resultado final fue la confirmación de vínculos epidemiológicos convencionales en trece de los dieciséis casos.

En la actualidad cualquier estrategia para el control y prevención de la tuberculosis debería combinar las técnicas moleculares para la genotipificación de cepas, con la metodología de trabajo propia de la epidemiológica convencional. Las aportaciones más significativas podrían resumirse en que: 1) es posible identificar, de manera objetiva, cadenas de transmisión y contribuir con ello la toma de decisiones tanto desde la perspectiva de la medicina preventiva como de la asistencial; 2) se pueden confirmar o excluir las posibles relaciones existentes en los casos de tuberculosis que sean motivo de alertas sanitarias abiertas por los servicios de Vigilancia Epidemiológica; 3) es posible desenmascarar casos que *a priori* podrían pasar desapercibidos; 4) contribuyen a revelar factores de riesgo a veces infravalorados; 5) detectan y permiten corregir los errores intra-laboratorio; 6) permiten diferenciar los casos de tuberculosis por reactivación endógena de los debidos a reinfección exógena; y 7) en general se mejora el conocimiento sobre las dinámicas de transmisión de la tuberculosis en nuestro medio. Consideramos que esta estrategia, junto con otras medidas complementarias, contribuiría a reducir el impacto de la tuberculosis en Asturias.



6. Conclusiones

1. La estrategia de genotipificación sistemática de todas las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en Asturias ha supuesto la incorporación de una herramienta diagnóstica objetiva con la que poder ahondar en las dinámicas de transmisión de la tuberculosis en nuestro medio.

2. Ha sido posible genotipar el más del 98% de las cepas de *M. tuberculosis* complex aisladas en Asturias durante el periodo junio 2004-diciembre 2010 mediante dos técnicas moleculares de referencia: RFLP-IS6110 y *Spoligotyping.*

3. Sabemos el número y distribución de los diferentes patrones genéticos de *M. tuberculosis* complex "circulantes" en Asturias con cada una de las técnicas empleadas. Es reseñable la gran variedad de genotipos circulantes en nuestro medio 913 por RFLP-IS6110 y 281 por *Spoligotyping*.

4. La tasa de agrupamiento de las cepas de *M. tuberculosis* complex aisladas en Asturias fue del 39,3% por RFLP-IS610 y del 86,3% por *Spoligotyping*. Las mayores tasas de agrupamiento se han detectado en las áreas sanitarias más pobladas y en las zonas urbanas.

5. Conocemos el número, la extensión, y la distribución de los *clusters* presentes en Asturias.

6. Se han identificado las cepas más prevalentes en nuestra Comunidad, también se ha podido constatar la expansión de cepas emergentes. El porcentaje de patrones "huérfanos" era del 54,6% por RFLP-IS610 y del 13,5% por *Spoligotyping.*

7. Los resultados obtenidos mediante RFLP-IS610 y *Spoligotyping* fueron coincidentes en un 19,5% y discrepantes en un 80,5%. Las discrepancias deben ser interpretadas ponderando los grados de similitud o de diferencia en los patrones obtenidos.

8. La especie *M. tuberculosis* representaba el 98,2% de los aislamientos del taxón *M. tuberculosis* complex en Asturias, le seguía *M. bovis* 1,2%; *M. africanum* 0,3%; y *M. bovis* BCG 0,15%. Del resto de especies incluidas en el taxón no se aisló en Asturias ninguna otra especie.

9. Se confirmó la presencia en Asturias de cepas importadas de *M. tuberculosis*, en algunos casos se pudo conocer incluso el momento y el lugar de su aparición, todo ello nos permite registrar su distribución y monitorizar las dinámicas de expansión y/o extinción de las mismas.

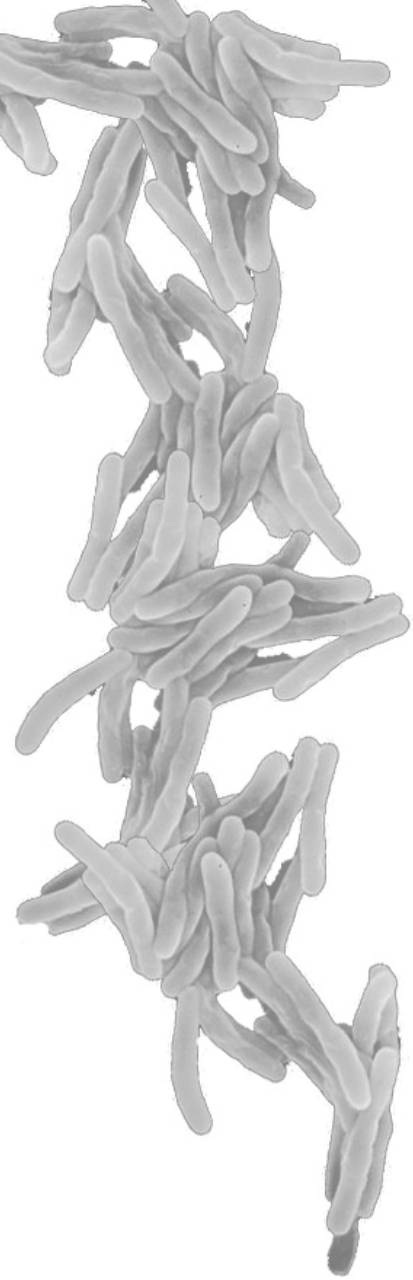
10. El genotipado de las cepas MDR-TB y XDR-TB presentes en Asturias, permitió excluir cualquier relación epidemiológica entre las mismas, y hasta la fecha, poder descartar casos secundarios.

11. Hemos identificado las cepas que más casos aglutinan en Asturias, lo que puede servir, independientemente del contexto clínico, para tomar decisiones de ampliación de los estudios convencionales de contactos cuando se produzcan nuevos casos de tuberculosis producidas por las mismas.

12. Se detectaron a tiempo algunos errores por contaminación cruzada intra-laboratorio, se evitó la emisión de informes con falsos diagnósticos de tuberculosis y se aplicaron medidas correctoras para minimizar este tipo de eventos.

13. Se pudo diferenciar entre reactivación y reinfección en aquellos pacientes en los que se disponía de las cepas implicadas en los diferentes episodios de tuberculosis.

14. Creemos que nuestro estudio demuestra que el uso simultáneo de dos herramientas moleculares supone un complemento imprescindible para la epidemiología de la tuberculosis. Proponemos que los Programas de Control de la Tuberculosis contemplen la necesidad de incorporar este tipo de soporte diagnóstico, pero siempre dentro de una estrategia de trabajo multidisciplinar que sirva de filtro para toda la información disponible, que permita adoptar medidas basadas en la evidencia, y con ello avanzar en el conocimiento de la tuberculosis.



7. Bibliografía

1. Acosta-Salinas R, Estrada-Chávez C, Milián-Suazo F. *Tipificación de cepas de Mycobacterium bovis. Revisión.* Técnica Pecuaria en México 2009; 47: 389-412.

2. Al Hajoj S, Rastogi N. *The emergence of Beijing genotype of Mycobacterium tuberculosis in the Kingdom of Saudi Arabia.* Ann Thorac Med. 2010 Jul; 5(3):149-52.

3. Al-Hajoj SA, Akkerman O, Parwati I, al-Gamdi S, Rahim Z, van Soolingen D, van Ingen J, Supply P, van der Zanden AG. *Microevolution of Mycobacterium tuberculosis in a tuberculosis patient.* J Clin Microbiol. 2010 Oct; 48(10):3813-6.

4. Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, Gey van Pittius NC. *Novel Mycobacterium tuberculosis complex pathogen, M. mungi.* Emerg Infect Dis. 2010 Aug; 16(8):1296-9.

5. Allix C, Walravens K, Saegerman C, Godfroid J, Supply P, Fauville-Dufaux M. *Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of Mycobacterium bovis and comparison of the method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and Spoligotyping.* J Clin Microbiol. 2006 Jun; 44(6):1951-62

6. Alonso M, Palacios JJ, Herranz M, Penedo A, Menéndez A, Bouza E, García de Viedma D. *Isolation of Mycobacterium tuberculosis strains with a silent mutation in rpoB leading to potential misassignment of resistance category.* J Clin Microbiol. 2011 Jul; 49(7):2688-90.

7. Barnes PF, Cave MD. *Molecular epidemiology of tuberculosis.* N Engl J Med. 2003 Sep 18; 349(12):1149-56.

8. Blázquez J, Espinosa de Los Monteros LE, Samper S, Martín C, Guerrero A, Cobo J, Van Embden J, Baquero F, Gómez-Mampaso E. *Genetic characterization of multidrug-resistant Mycobacterium bovis strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus-positive patients.* J Clin Microbiol. 1997 Jun; 35(6):1390-3.

9. Blot M. *Transposable elements and adaptation of host bacteria.* Genetica. 1994; 93(1-3):5-12.

10. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, Allen J, Tahirli R, Blakemore R, Rustomjee R, Milovic A, Jones M, O'Brien SM, Persing DH, Ruesch-Gerdes S, Gotuzzo E, Rodrigues C, Alland D, Perkins MD. *Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance.* N Engl J Med. 2010 Sep 9; 363(11):1005-15.

11. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajoj SA, Allix C, Aristimuño L, Arora J, Baumanis V, Binder L, Cafrune P, Cataldi A, Cheong S, Diel R, Ellermeier C, Evans JT, Fauville-Dufaux M, Ferdinand S, García de Viedma D, Garzelli C, Gazzola L, Gomes HM, Gutierrez MC, Hawkey PM, van Helden PD, Kadival GV, Kreiswirth BN, Kremer K, Kubin M, Kulkarni SP, Liens B, Lillebaek T, Ho ML, Martin C, Martin C, Mokrousov I, Narvskaïa O, Ngeow YF, Naumann L, Niemann S, Parwati I, Rahim Z, Rasolofo-Razanamparany V, Rasolonavalona T, Rossetti ML, Rüsch-Gerdes S, Sajduda A, Samper S, Shemyakin IG, Singh UB, Somoskovi A, Skuce RA, van Soolingen D, Streicher EM, Suffys PN, Tortoli E, Tracevska T, Vincent V, Víctor TC, Warren RM, Yap SF, Zaman K, Portaels F, Rastogi N, Sola C. *Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international Spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology*. BMC Microbiol. 2006 Mar 6; 6:23.
http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/

12. Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, Rodríguez JC, Afonso O, Martin C, Pavón JM, Torres MJ, Burgos M, Cabrera P, Small PM, Enarson DA. *Exogenous reinfection with tuberculosis on a European island with a moderate incidence of disease*. Am J Respir Crit Care Med. 2001 Mar; 163(3 Pt 1):717-20.

13. Canadian Tuberculosis Comittee (CTC). *Recommendations on Interferon Gamma Release Assays for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection—2010 Update.* Canada Comunicable Disease Report (CCDR). 2010 Jun; 36 (AC5-5):1-22.

14. Catanzaro A, Davidson BL, Fujiwara PI, Goldberger MJ, Gordin F, Salfinger M, Sbabaro J, Schluger NW, Sierro MF, Woods GL. *Rapid diagnostic tests for tuberculosis: what is the appropriate use? American Thoracic Society Workshop*. Am J Respir Crit Care Med. 1997 May; 155(5):1804-14.

15. Centers for Disease Control and Prevention. *Treatment of Tuberculosis*, American Thoracic Society, CDC, and Infectious Diseases Society of America. MMWR 2003; 52(No. RR-11).

16. Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W. *The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes.* Nature. 1994 Sep 15; 371(6494):215-20.

17. Choi GE, Jang MH, Song EJ, Jeong SH, Kim JS, Lee WG, Uh Y, Roh KH, Lee HS, Shin JH, Ryoo NH, Kim YR, Jeong J, Kim JH, Lee SM, Yi J, Hwang SH, Kim HH, Lee EY, Chang CL, Kim MB, Kim YD. *IS6110-restriction fragment length polymorphism and Spoligotyping analysis of Mycobacterium tuberculosis clinical isolates for investigating epidemiologic distribution in Korea.* J Korean Med Sci. 2010 Dec; 25(12):1716-21.

18. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence.* Nature. 1998 Jun 11; 393(6685):537-44.

19. Cox HS, Kubica T, Doshetov D, Kebede Y, Rüsch-Gerdess S, Niemann S. *The Beijing genotype and drug resistant tuberculosis in the Aral Sea region of Central Asia.* Respir Res. 2005 Nov 8; 6:134.

20. de C. Ramos M, Soini H, Roscanni GC, Jaques M, Villares MC, Musser JM. *Extensive cross-contamination of specimens with Mycobacterium tuberculosis in a reference laboratory.* J Clin Microbiol. 1999 Apr; 37(4):916-9.

21. Dahle UR, Sandven P, Heldal E, Caugant DA. *Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis in Norway.* J Clin Microbiol. 2001 May; 39(5):1802-7.

22. Dale JW, Brittain D, Cataldi AA, Cousins D, Crawford JT, Driscoll J, Heersma H, Lillebaek T, Quitugua T, Rastogi N, Skuce RA, Sola C, Van Soolingen D, Vincent V. *Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the Mycobacterium tuberculosis complex: recommendations for standardised nomenclature.* Int J Tuberc Lung Dis. 2001 Mar; 5(3):216-9.

23. Diel R, Seidler A, Nienhaus A, Rüsch-Gerdes S, Niemann S. *Occupational risk of tuberculosis transmission in a low incidence area.* Respir Res. 2005 Apr 14; 6:35.

24. Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A. *Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a metaanalysis.* Chest. 2010 Apr; 137(4):952-68. Review.

25. Division of Tuberculosis Elimination, National Center for HIV, STD, and TB Prevention, CDC. Updated Guidelines for Using Interferon Gamma Release Assays to Detect Mycobacterium tuberculosis Infection. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR).* 2010 Jun 25; 59(RR05):1-25.

26. Dobler CC, McDonald SP, Marks GB. *Risk of tuberculosis in dialysis patients: a nationwide cohort study.* PLoS One. 2011; 6(12):e29563.

27. Dou HY, Tseng FC, Lin CW, Chang JR, Sun JR, Tsai WS, Lee SY, Su IJ, Lu JJ. *Molecular epidemiology and evolutionary genetics of Mycobacterium tuberculosis in Taipei.* BMC Infect Dis. 2008 Dec 22; 8:170.

28. Drobniewski FA, Caws M, Gibson A, Young D. *Modern laboratory diagnosis of tuberculosis.* Lancet Infect Dis. 2003 Mar; 3(3):141-7. Review.

29. Drobniewski FA, Hoffner S, Rusch-Gerdes S, Skenders G, Thomsen V; WHO European Laboratory Strengthening Task Force. *Recommended standards for modern tuberculosis laboratory services in Europe.* Eur Respir J. 2006 Nov; 28(5):903-9.

30. Elizaga J, Carrero P, Iñigo J, Chaves F. *Recent transmission of tuberculosis in an area with low incidence: epidemiological and molecular study.* Med Clin (Barc). 2002 May 11; 118(17):645-9.

31. Ellis BA, Crawford JT, Braden CR, McNabb SJ, Moore M, Kammerer S; National Tuberculosis Genotyping and Surveillance Network Work Group. *Molecular epidemiology of tuberculosis in a sentinel surveillance population.* Emerg Infect Dis. 2002 Nov; 8(11):1197-209.

32. Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L, Boulahbal F, Kim SJ, Reniero A, Hoffner S, Rieder HL, Binkin N, Dye C, Williams R, Raviglione MC.*Global trends in resistance to antituberculosis drugs.* N Engl J Med. 2001 Apr 26; 344(17):1294-1303.

33. European Centre for Disease Prevention and Control. *Use of interferon-gamma release assays in support of TB diagnosis.* Stockholm: ECDC; 2011.

34. European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe. *Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2012.* Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control, 2012.

35. Evans JT, Smith EG, Banerjee A, Smith RM, Dale J, Innes JA, Hunt D, Tweddell A, Wood A, Anderson C, Hewinson RG, Smith NH, Hawkey PM, Sonnenberg P. *Cluster of human tuberculosis caused by Mycobacterium bovis: evidence for person-to-person transmission in the UK*. Lancet. 2007 Apr 14; 369(9569):1270-6.

36. Farnia P, Mohammadi F, Masjedi MR, Varnerot A, Zarifi AZ, Tabatabee J, Douraghei M, Ghazisaeedi K, Mansorri D, Bahadori M, Vincent V, Gutierrez C, Velayati AA. *Evaluation of tuberculosis transmission in Tehran: using RFLP and spoligotyping methods*. J Infect. 2004 Aug; 49(2):94-101.

37. Friedman CR, Stoeckle MY, Johnson WD Jr, Riley LW. *Double-repetitive-element PCR method for subtyping Mycobacterium tuberculosis clinical isolates*. J Clin Microbiol. 1995 May; 33(5):1383-4.

38. García MR, Rodríguez JC, Navarro JF, Samper S, Martín C, Royo G. *Molecular epidemiology of tuberculosis in Elche, Spain: a 7-year study*. J Med Microbiol. 2002 Mar; 51(3):273-7.

39. García-González P, Varela M, Palacios JJ, Rodrigo L. *Peritoneal tuberculosis due to Mycobacterium bovis in a cirrhotic patient.* Gastroenterol Hepatol. 2009 Aug-Sep; 32(7):495-8.

40. García de Viedma D, Marín M, Ruiz Serrano MJ, Alcalá L, Bouza E. *Polyclonal and compartmentalized infection by Mycobacterium tuberculosis in patients with both respiratory and extrarespiratory involvement*. J Infect Dis. 2003 Feb 15; 187(4):695-9.

41. García de Viedma D, Bouza E, Rastogi N, Sola C. *Analysis of Mycobacterium tuberculosis genotypes in Madrid and identification of two new families specific to Spain-related settings*. J Clin Microbiol. 2005 Apr; 43(4):1797-806.

42. Gibson AL, Hewinson G, Goodchild T, Watt B, Story A, Inwald J, Drobniewski FA. *Molecular epidemiology of disease due to Mycobacterium bovis in humans in the United Kingdom*. J Clin Microbiol. 2004 Jan; 42(1):431-4.

43. Goguet de la Salmonière YO, Li HM, Torrea G, Bunschoten A, van Embden J, Gicquel B. *Evaluation of Spoligotyping in a study of the transmission of Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 1997 Sep; 35(9):2210-4.

44. Gori A, Bandera A, Marchetti G, Degli Esposti A, Catozzi L, Nardi GP, Gazzola L, Ferrario G, van Embden JD, van Soolingen D, Moroni M, Franzetti F. *Spoligotyping and Mycobacterium tuberculosis*. Emerg Infect Dis. 2005 Aug; 11(8):1242-8.

45. Goulding JN, Stanley J, Saunders N, Arnold C. *Genome-sequence-based fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2000 Mar; 38(3):1121-6.

46. Goyal M, Saunders NA, van Embden JD, Young DB, Shaw RJ. *Differentiation of Mycobacterium tuberculosis isolates by Spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism.* J Clin Microbiol. 1997 Mar; 35(3):647-51.

47. Harmsen D, Rothgänger J, Frosch M, Albert J. *RIDOM: Ribosomal Differentiation of Medical Micro-organisms Database.* Nucleic Acids Res. 2002 Jan 1; 30(1):416-7.

48. Hatfull GF, Jacobs WR Jr. *Molecular Genetics of Mycobacteria.* American Society for Microbiology Press. Washington D.C: 2000.

49. Howard DH, Scott RD 2nd, Packard R, Jones D. *The global impact of drug resistance.* Clin Infect Dis. 2003 Jan 15; 36(Suppl 1):S4-10.

50. Huard RC, Lazzarini LC, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL. *PCR-based method to differentiate the subspecies of the Mycobacterium tuberculosis complex on the basis of genomic deletions.* J Clin Microbiol. 2003 Apr; 41(4):1637-50.

51. Íñigo Martínez J, Arce Arnáez A, Chaves Sánchez F, Palenque Mataix E, Burgoa Arenales M. *Patrones de transmisión de la tuberculosis en un área sanitaria de Madrid.* Rev Esp Salud Pública. 2003 Sep-Oct; 77(5):541-51.

52. Jasmer RM, Roemer M, Hamilton J, Bunter J, Braden CR, Shinnick TM, Desmond EP. *A prospective, multicenter study of laboratory cross-contamination of Mycobacterium tuberculosis cultures*. Emerg Infect Dis. 2002 Nov; 8(11):1260-3.

53. Jassal M, Bishai WR. *Extensively drug-resistant tuberculosis.* Lancet Infect Dis. 2009 Jan; 9(1):19-30.

54. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J. *Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology*. J Clin Microbiol. 1997 Apr; 35(4):907-14.

55. Kasai H, Ezaki T, Harayama S. *Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their gyrB sequences*. J Clin Microbiol. 2000 Jan; 38(1):301-8.

56. Kaufmann SH, Rubin E. *Handbook of Tuberculosis: Molecular biology and Biochemistry.* Wiley-VCH 2008.

57. Kaufmann SH, Britton W. *Handbook of Tuberculosis: Inmunology and cell biology.* Wiley-VCH 2008.

58. Kaufmann SH, van Helden P. *Handbook of Tuberculosis: Clinics, Diagnostic, Therapy and Epidemiology.* Wiley-VCH 2008.

59. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martín C, Palittapongarnpim P, Plikaytis BB, Riley LW, Yakrus MA, Musser JM, van Embden JD. *Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of Mycobacterium tuberculosis complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility.* J Clin Microbiol. 1999 Aug; 37(8):2607-18.

60. Kulaga S, Behr M, Musana K, Brinkman J, Menzies D, Brassard P, Kunimoto D, Tannenbaum TN, Thibert L, Joseph L, Boivin JF, Schwartzman K. *Molecular epidemiology of tuberculosis in Montreal.* CMAJ. 2002 Aug 20; 167(4):353-4

61. Kulaga S, Behr M, Nguyen D, Brinkman J, Westley J, Menzies D, Brassard P, Tannenbaum T, Thibert L, Boivin JF, Joseph L, Schwartzman K. *Diversity of Mycobacterium tuberculosis isolates in an immigrant population: evidence against a founder effect.* Am J Epidemiol. 2004 Mar 1; 159(5):507-13.

62. Lalvani A, Pathan AA, McShane H, Wilkinson RJ, Latif M, Conlon CP, Pasvol G, Hill AV. *Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells.* Am J Respir Crit Care Med. 2001 Mar; 163(4):824-8.

63. Lalvani A, Pathan AA, Durkan H, Wilkinson KA, Whelan A, Deeks JJ, Reece WH, Latif M, Pasvol G, Hill AV. *Enhanced contact tracing and spatial tracking of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells.* Lancet. 2001 Jun 23; 357(9273):2017-21.

64. Legrand E, Filliol I, Sola C, Rastogi N. *Use of Spoligotyping to study the evolution of the direct repeat locus by IS6110 transposition in Mycobacterium tuberculosis.* J Clin Microbiol. 2001 Apr; 39(4):1595-9.

65. Manzano JR, Blanquer R, Calper JL, Caminero JA, Caylà J, Domínguez JA, García JM, Vidal R. *Diagnóstico y tratamiento de la Tuberculosis.* Arch. Bronconeumol. 2008; 44(10):551-66.

66. Maradona JA. *Tuberculosis: Historia de su conocimiento.* Universidad de Oviedo, Servicio de publicaciones. 2009.

67. Martín A, Herranz M, Ruiz Serrano MJ, Bouza E, García de Viedma D. *The clonal composition of Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens could be modified by culture*. Tuberculosis (Edinb). 2010 May; 90(3):201-7.

68. Martínez M, García de Viedma D, Alonso M, Andrés S, Bouza E, Cabezas T, Cabeza I, Reyes A, Sánchez-Yebra W, Rodríguez M, Sánchez MI, Rogado MC, Fernández R, Peñafiel T, Martínez J, Barroso P, Lucerna MA, Diez LF, Gutiérrez C. *Impact of laboratory cross-contamination on molecular epidemiology studies of tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2006 Aug; 44(8):2967-9.

69. Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. *Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights*. Clin Microbiol Rev. 2006 Oct; 19(4):658-85.

70. Mellado Peña MJ, Moreno-Pérez D, Ruíz Contreras J, Hernández-Sampelayo Matos T, Navarro Gómez ML; Grupo de colaboradores del Documento de Consenso SEIP-CAV de la AEP; Sociedad Española de Infectología Pediátrica; Comité Asesor de Vacunas de la Asociación Española de Pediatría. *Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis*. An Pediatr (Barc). 2011 Dec; 75(6):413.e1-22.

71. Mitnick CD, Appleton SC, Shin SS. *Epidemiology and treatment of multidrug resistant tuberculosis*. Semin Respir Crit Care Med. 2008 Oct; 29(5):499-524.

72. Moro ML, Salamina G, Gori A, Penati V, Sacchetti R, Mezzetti F, Infuso A, Sodano L. *Two-year population-based molecular epidemiological study of tuberculosis transmission in the metropolitan area of Milan, Italy*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002 Feb; 21(2):114-22.

73. Moström P, Gordon M, Sola C, Ridell M, Rastogi N. *Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis.* Clin Microbiol Infect. 2002 Nov; 8(11):694-704.

74. Nava-Aguilera E, López-Vidal Y, Harris E, Morales-Pérez A, Mitchell S, Flores-Moreno M, Villegas-Arrizón A, Legorreta-Soberanis J, Ledogar R, Andersson N. *Clustering of Mycobacterium tuberculosis cases in Acapulco: Spoligotyping and risk factors*. Clin Dev Immunol. 2011; 2011:408375.

75. Navarro Y, Herranz M, Pérez-Lago L, Martínez Lirola M; INDAL-TB, Ruiz-Serrano MJ, Bouza E, García de Viedma D. *Systematic survey of clonal complexity in tuberculosis at a populational level and detailed characterization of the isolates involved*. J Clin Microbiol. 2011 Dec; 49(12):4131-7.

76. Niemann S, Richter E, Rüsch-Gerdes S. *Stability of Mycobacterium tuberculosis IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns and spoligotypes determined by analyzing serial isolates from patients with drug-resistant tuberculosis.* J Clin Microbiol. 1999 Feb; 37(2):409-12.

77. Niemann S, Harmsen D, Rüsch-Gerdes S, Richter E. *Differentiation of clinical Mycobacterium tuberculosis complex isolates by gyrB DNA sequence polymorphism analysis.* J Clin Microbiol. 2000 Sep; 38(9):3231-4.

78. Noordhoek GT, van Embden JD, Kolk AH. *Reliability of nucleic acid amplification for detection of Mycobacterium tuberculosis: an international collaborative quality control study among 30 laboratories.* J Clin Microbiol. 1996 Oct; 34(10):2522-5.

79. Otal I, Martín C, Vincent-Lévy-Frebault V, Thierry D, Gicquel B. *Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in tuberculosis.* J Clin Microbiol. 1991 Jun; 29(6):1252-4.

80. Pai M, Zwerling A, Menzies D. *Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update.* Ann Intern Med. 2008 Aug 5; 149(3):177-84.

81. Palacios JJ, García JM, Ferro J, Rodríguez J, Sánchez A, Villar H, Muñiz MM, Marrón MG, Ozores M, Calvo C, Prendes P. *Comparison of MB-check and Löwenstein-Jensen media for recovery of mycobacteria.* Microsc Res Tech. 1997 Sep 1; 38(5):512-8.

82. Palacios JJ, Ferro J, Ruiz Palma N, Roces SG, Villar H, Rodríguez J, Prendes P. *Comparison of the ligase chain reaction with solid and liquid culture media for routine detection of Mycobacterium tuberculosis in nonrespiratory specimens.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1998 Nov; 17(11):767-72.

83. Palacios JJ, Ferro J, Ruiz Palma N, García JM, Villar H, Rodríguez J, Macías MD, Prendes P. *Fully automated liquid culture system compared with Löwenstein-Jensen solid medium for rapid recovery of mycobacteria from clinical samples.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1999 Apr; 18(4):265-73.

84. Parsons LM, Brosch R, Cole ST, Somoskövi A, Loder A, Bretzel G, Van Soolingen D, Hale YM, Salfinger M. *Rapid* and *simple approach* for *identification* of *Mycobacterium tuberculosis complex isolates* by *PCR-based genomic deletion analysis.* J Clin Microbiol. 2002 Jul; 40(7):2339-45.

85. Portugal I, Barreiro L, Vultos T, Macedo R, Furtado C, Fonseca Antunes A, Brum L. *Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis in Lisbon*. Rev Port Pneumol. 2008 Mar-Apr; 14(2):239-59.

86. Purwar S, Chaudhari S, Katoch VM, Sampath A, Sharma P, Upadhyay P, Chauhan DS. *Determination of drug susceptibility patterns and genotypes of Mycobacterium tuberculosis isolates from Kanpur district, North India*. Infect Genet Evol. 2011 Mar; 11(2):469-75.

87. Ruddy M, McHugh TD, Dale JW, Banerjee D, Maguire H, Wilson P, Drobniewski F, Butcher P, Gillespie SH. *Estimation of the rate of unrecognized cross-contamination with mycobacterium tuberculosis in London microbiology laboratories*. J Clin Microbiol. 2002 Nov; 40(11):4100-4.

88. Runyon EH. *Anonymous mycobacteria in pulmonary disease.* Med Clin North Am. 1959 Jan; 43(1):273-90.

89. Safi H, Aznar J, Palomares JC. *Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis strains isolated during a 3-year period (1993 to 1995) in Seville, Spain*. J Clin Microbiol. 1997 Oct; 35(10):2472-6.

90. Samper S, Iglesias MJ, Rabanaque MJ, Lezcano MA, Vitoria LA, Rubio MC, Gómez-Lus R, Gómez LI, Otal I, Martín C. *The molecular epidemiology of tuberculosis in Zaragoza, Spain: a retrospective epidemiological study in 1993*. Int J Tuberc Lung Dis. 1998 Apr; 2(4):281-7.

91. Sanz-Peláez O, Caminero-Luna JA, Pérez-Arellano JL. *Tuberculosis and immigration in Spain. Evidences and controversies*. Med Clin (Barc). 2006 Feb 25; 126(7):259-69.

92. Saunders NA, Metherell L, Patel S. *Investigation of an outbreak of multidrug resistant tuberculosis among renal patients using rpo B gene sequencing and IS6110 inverse PCR*. J Infect. 1997 Sep; 35(2):129-33.

93. Schluger NW. *Changing approaches to the diagnosis of tuberculosis.* Am J Respir Crit Care Med. 2001 Dec 1; 164(11):2020-4.

94. Sunder S, Lanotte P, Godreuil S, Martin C, Boschiroli ML, Besnier JM. *Human-to-human transmission of tuberculosis caused by Mycobacterium bovis in immunocompetent patients*. J Clin Microbiol. 2009 Apr; 47(4):1249-51.

95. Supply P, Magdalena J, Himpens S, Locht C. *Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon.* Mol Microbiol. 1997 Dec; 26(5):991-1003.

96. Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. *Variable human minisatellite-like regions in the Mycobacterium tuberculosis genome.* Mol Microbiol. 2000 May; 36(3):762-71.

97. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, van Soolingen D. *Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis.* J Clin Microbiol. 2006 Dec; 44(12):4498-510. Epub 2006 Sep 27.

98. Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, T. Matsuo Sponsor Referee. *Protein and polymer analyses up to* m/z *100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1988 Ago; 2(8):151-153.

99. Van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM. *Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology.* J Clin Microbiol. 1993 Feb; 31(2):406-9.

100. Van Embden JD, van Gorkom T, Kremer K, Jansen R, van Der Zeijst BA, Schouls LM. *Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria.* J Bacteriol. 2000 May; 182(9):2393-401.

101. Van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F, Qing HZ, Enkhsaikan D, Nymadawa P, van Embden JD. *Predominance of a single genotype of Mycobacterium tuberculosis in countries of east Asia.* J Clin Microbiol. 1995 Dec; 33(12):3234-8.

102. Warren RM, van der Spuy GD, Richardson M, Beyers N, Booysen C, Behr MA, van Helden PD. *Evolution of the IS6110-based restriction fragment length polymorphism pattern during the transmission of Mycobacterium tuberculosis.* J Clin Microbiol. 2002 Apr; 40(4):1277-82.

103. World Health Organization (WHO). *Directly Observed Therapy for Tuberculosis.* 1995.

104. World Health Organization (WHO). *Stop TB partnership's global plan to stop TB 2006-2015.* 2006. Geneva: WHO.

105. World Health Organization (WHO). *Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR.TB): recommendations for prevention and control.* Weekly Epidemiol Record 2006; 81: 430-432.

106. World Health Organization (WHO). *Treatment of tuberculosis: guidelines – 4th ed.* 2009.

107. World Health Organization (WHO). *Global tuberculosis control: WHO report 2011.* 2011. Geneva: WHO.

108. Yamamoto S, Harayama S. PCR *Amplification and Direct Sequencing of gyrB Genes with Universal Primers and Their Application to the Detection and Taxonomic Analysis of Pseudomonas putida Strains.* Appl Environ Microbiol. 1995 Oct; 61(10):3768.

109. Zumárraga MJ, Martin C, Samper S, Alito A, Latini O, Bigi F, Roxo E, Cicuta ME, Errico F, Ramos MC, Cataldi A, van Soolingen D, Romano MI. *Usefulness of Spoligotyping in molecular epidemiology of Mycobacterium bovis-related infections in South America.* J Clin Microbiol. 1999 Feb; 37(2):296-303.

8. Anexos

Publicaciones

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, July 2011, p. 2688–2690 Vol. 49, No. 7
0095-1137/11/$12.00 doi:10.1128/JCM.00659-11
Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* Strains with a Silent Mutation in *rpoB* Leading to Potential Misassignment of Resistance Category▽

María Alonso[1,2], Juan José Palacios[3], Marta Herranz [1,2], Ana Penedo[3], Ángela Menéndez[3], Emilio Bouza[1,2,] and Darío García de Viedma[1,2] ▽

Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas, Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain[1]; CIBER Enfermedades Respiratorias-CIBERES, Spain[2]; and Unidad de Referencia Regional de Micobacterias, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain[3]

Received 3 April 2011/Returned for modification 24 April 2011/Accepted 28 April 2011

Our study provides an alert regarding the transmission of rifampin-susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* with a silent substitution in codon 514 of *rpoB*. Among 1,450 cases, we identified 12 isolates sharing this mutation and related restriction fragment length polymorphism (RFLP) types. The mutation impaired hybridization with the wild-type probes in three independent commercial assays, which could lead to misas-signment of resistance.

The demand for rapid detection of resistance in *Mycobacte-rium tuberculosis* has led to a switch from standard phenotyping assays to faster genotyping assays able to identify resistance mutations directly from clinical specimens.

Solid-phase hybridization tests use amplified DNA from the clinical isolate and a set of immobilized probes (containing wild-type [wt] and mutant alleles) and have proven to be effi-cient when applied prospectively (2, 4, 11). Resistance to ri-fampin (RIF) is assumed to be present when hybridization is observed with the probes including resistance mutations but not with the wt probe. However, as commercial designs do not include probes for all of the possible mutations in the RIF resistance-determining region (RRDR), the test instructions state that lack of hybridization with the wt probes allows the investigator to indirectly assume resistance, even in the ab-sence of hybridization with the mutant probes.

Our primary objective was to evaluate the frequency of this pattern (no hybridization with the wt probe/no hybridization with the mutant probes), which leads to the indirect assump-tion of RIF resistance. We also analyzed whether this pattern could also be due to substitutions in the RRDR that impaired hybridization with the wt probe but were not associated with resistance. Therefore, we analyzed data from a reverse-hybrid-ization assay (INNO-LiPA RIF.TB; Innogenetics NV, Ghent, Belgium) that was systematically performed between 2004 and 2011 on all *M. tuberculosis* isolates from independent tubercu-losis (TB) cases received in the Mycobacteriology Reference Unit (1,084,341 inhabitants) of Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo, Spain). Both absence of hybridization with the wt probe S1 and absence of hybridization with the mutant probes were observed in 12 isolates of the 1,450 tested (all during 2006 to 2011; four were involved in a nosocomial cluster) (5) (Fig. 1). The reverse-hybridization test result was not reported to the clinician in any of the 12 cases, and the reference laboratory decided to wait for data from the antibi-ogram. All 12 isolates were pansusceptible by the agar propor-tion method (the RIF MICs were □1 0g/ml) according to an international standard (15) and by Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden) (the RIF MICs were □0.125 0g/ml). Once we ob-served mutations impairing hybridization with the RIF wt probe but not associated with resistance, we evaluated other commercial genotyping tests applied to these isolates (Fig. 1). The GenoType MTBDR*plus* assay (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany) showed no hybridization with the *rpoB* WT3 probe or with the *rpoB* mutant probes, and the Gene-Xpert MTB/RIF system (Cepheid, Sunnyvale, California) re-vealed no amplification detection by probe B.

Finally, we sequenced the RRDR in order to define the specific mutations in the 12 isolates sharing these abnormal behaviors. Unexpectedly, all 12 isolates shared the same mu-tation, namely, TTC/TTT, a silent mutation in Phe514.

This mutation has only been anecdotally reported in the literature, accompanying another substitution associated with resistance (in codon 531) (10), and it has recently been found in several isolates in the United States (Grace Lin, California Department of Public Health, personal communication). The fact that it was shared by all 12 isolates in our study suggested that they, and not only those involved in the nosocomial clus-ter, could be clonally related. We applied IS*6110* restriction fragment length polymorphism (RFLP), spoligotyping, and mycobacterial interspersed repetitive-unit–variable-number tandem-repeat (MIRU-VNTR) analysis (24-locus format). The four isolates from the nosocomial cluster, together with another unrelated isolate (310001322), shared identical RFLP types, MIRU types, and spoligotypes (Fig. 2, group I). Another group of four isolates (Fig. 2, group II) shared identical pat-terns by all three techniques; these patterns resembled those of group I, although with subtle differences in mobility and the presence/absence of certain bands and allelic variants at some MIRU loci. Spoligotyping revealed marked differences be-tween the group I pattern and the group II pattern, with eight additional absent spacers adjacent to those that were absent in the group I pattern. Differences in adjacent spacers between the spoligotypes of epidemiologically linked cases can arise as

* Corresponding author. Mailing address: Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Maran˜o´n, C/ Dr. Esquerdo, 46, 28007 Madrid, Spain. Phone: 91 4265104. Fax: 91 5044906. E-mail: dgviedma@microb.net. □ Published ahead of print on 11 May 2011.

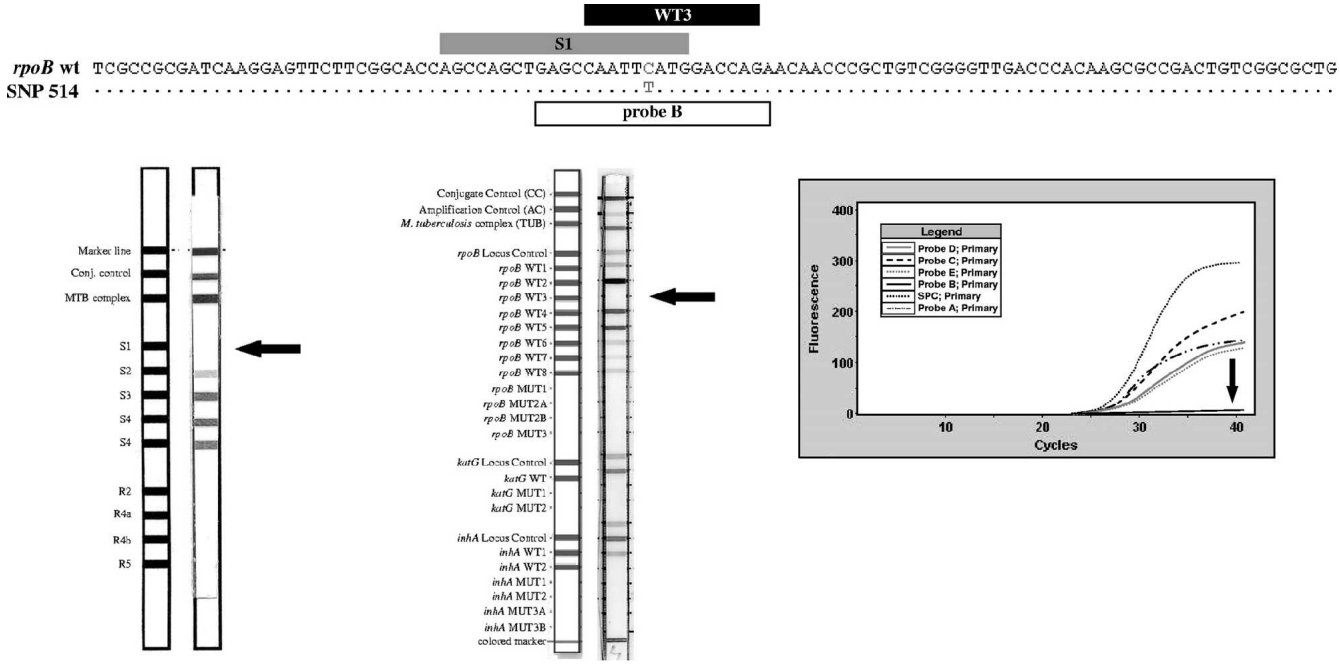


FIG. 1. Top: reference RRDR wt sequence aligned with a representative sequence of the 12 isolates harboring the single nucleotide polymorphism (SNP) in codon 514. The regions covered by probes homologous with the wt sequence in INNO-LiPA, GenoType MTBDR*plus*, and GeneXpert are shown above the sequences (in gray, black, and white, respectively). Bottom: results for a representative isolate with the different genotyping techniques. From left to right, INNO-LiPA, GenoType MTBDR*plus*, and GeneXpert.

a result of single independent rearrangements in the direct repeat (DR) region of clonally related isolates (13). The remaining three isolates shared identical or highly similar spoli-gotypes but showed a certain degree of difference from the group I and II patterns (Fig. 2).

The finding of 12 cases sharing this silent substitution in the RRDR, which may be responsible for misassignment of resis-tance, could be due to one of the following two scenarios.

Scenarios. (i) Convergent scenario. The silent mutation in codon 514 of *rpoB* was acquired by independent unrelated strains. Thus, we would expect completely different genotypic features for each of the strains. Instead, apart from the identity of the isolates involved in the nosocomial cluster, a certain global similarity between the genotyping patterns was observed for most of the remaining cases.

(ii) Divergent scenario. The strains sharing the silent muta-tion at codon 514 come from a common ancestor, since very few isolates harbored this substitution (only 12 out of 1,450). Other singular genotypic features found in the patterns for the strains sharing the 514 mutation were allele 4 in the MIRU16 locus, which was identified in only 135 strains (7.6%) of the 1,779 MIRU types obtained in our laboratory, and the fact that some of the spoligotypes detected were specific for these iso-lates and either not registered or underrepresented in the Asturias regional spoligotype database (2004 to 2011) and in the international SpolDB4 database (3). It could be considered

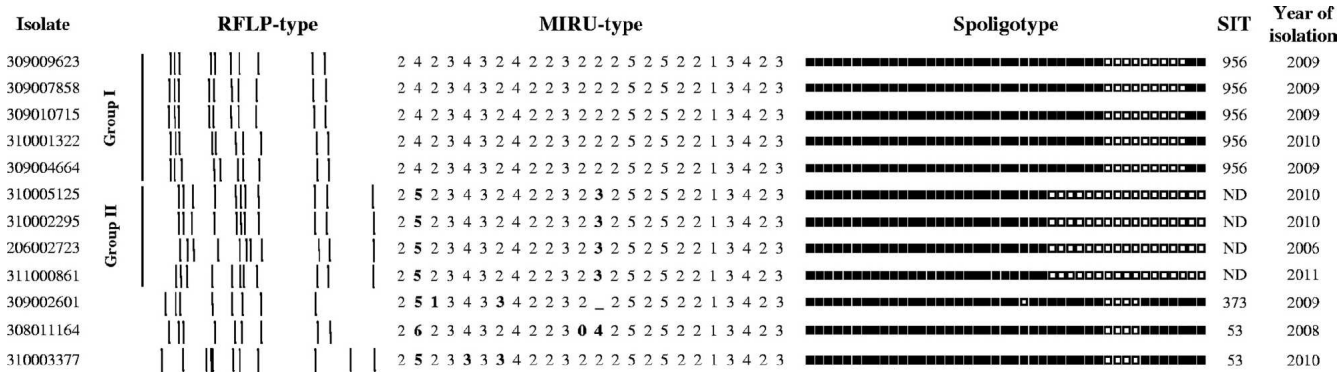


FIG. 2. IS*6110* RFLP, MIRU-VNTR, and spoligotyping results for all the isolates. MIRU alleles with differences are indicated in boldface. The isolates were grouped according to similarity (groups I and II). The SIT number and the year of isolation are included. SIT, spoligo-international-type number according to the designation of the SpolDB4 database

that our observations are region specific; additional studies in other contexts are needed to clarify this possibility. The hy-pothesis of a common ancestor in our study allows for a certain degree of microevolution, probably during transmission from one to another of the 12 hosts over a 6-year period. Partial modification of the genotyping patterns during transmission chains has been reported (1, 6, 9, 12, 14), and the same may have occurred in our cases. Nevertheless, we recognize that the heterogeneity observed was higher than expected. With respect to the host, bacilli could have the opportunity to microevolve faster due to diagnostic delay, substandard therapy, and poor adherence (14). No evidence of failed therapy or adherence was found for the cases analyzed, although diagnostic delay was found in five cases (1, 2, 4, 6, and 8 months). In addition, certain bacterial mechanisms have been found to be responsi-ble for the faster generation of variability in specific *M. tuber-culosis* strains (7, 8).

Our study provides an alert regarding the existence of silent mutations in the RRDR that are able to impair binding with wt probes in hybridization-based commercial genotyping assays, a pattern that can be interpreted as an indicator of resistance. The credibility gained by commercial genotyping tests for de-tecting resistance in *M. tuberculosis* means that they play an important role in therapeutic decision making. New probes must be designed and included in the commercial tests to rule out misassignment of resistance caused by phenomena such as that described here. However, hybridization failures with wt probe(s) in the absence of hybridization with mutant probes should be investigated by direct sequencing before assigning resistance. Analysis of isolates showing this abnormal hybrid-ization pattern revealed the accumulation of related isolates sharing an identical silent mutation whose relatedness had not been suspected using standard genotyping methods applied to *M. tuberculosis*.

We are indebted to Martínez Lirola, who shared with us the original idea on which this study is based. We are grateful for the participation of Ainhoa Simo´n Za´rate and Milagros Gonza´lez in the sequencing analysis.

María Alonso is supported by a contract (REF CA09/00054) from the Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigaciones Sanitarias) and provides technical support in the Unidad Central de Ana´lisis Molecular of Hospital General Universitario Gregorio Maran˜o´n. The study was partially financed by Fondo de Investigaciones Sanitarias (grant S09/02205). Ainhoa Simo´n Za´rate, who participated in the se-quencing analysis, holds a grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (Línea Instrumental Secuenciacio´n). The 3130xl Genetic Analyzer was partially financed by grants from Fondo de Investigacio-nes Sanitarias (grants IF01-3624 and IF08-36173).

We thank the Microbiology Laboratories of Servicio de Salud del Principado de Asturias SESPA (María Isabel Blanco, Lucía Barreiro, Henar Villar, Aurora Torreblanca, Elisa Hidalgo, Julio Díaz, Flor Hidalgo, and Soledad Calzo´n) for providing strains. We thank Dolores Pe´rez Herna´ndez from Servicio de Vigilancia y Alertas Epidemiolo´gi-cas (Direccio´n General de Salud Pu´blica y Participacio´n del Princi-pado de Asturias) for the clinical and epidemiological information provided.

We thank Thomas O'Boyle for proofreading the manuscript.

REFERENCES

1. **Alito, A., et al.** 1999. The IS6110 restriction fragment length polymorphism in particular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains may evolve too fast for reliable use in outbreak investigation. J. Clin. Microbiol. **37:**788–791.
2. **Barnard, M., H. Albert, G. Coetzee, R. O'Brien, and M. E. Bosman.** 2008. Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **177:**787–792.
3. **Brudey, K., et al.** 2006. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diver-sity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol. **6:** 23–39.
4. **Bwanga, F., S. Hoffner, M. Haile, and M. L. Joloba.** 2009. Direct suscepti-bility testing for multi drug resistant tuberculosis: a meta-analysis. BMC Infect. Dis. **9:**67–81.
5. **Casas-Fisher, R., A. Penedo-Pallares, J. J. Palacios-Gutie´rrez, and A. Moreno-Torrico.** 30 May 2011, posting date. Outbreak or coincidental cases of tuberculosis? Genotyping gives the clue. Am. J. Infect. Control. doi: 10.1016/j.ajic.2011.03.003.
6. **Cave, M. D., et al.** 2005. Epidemiologic import of tuberculosis cases whose isolates have similar but not identical IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns. J. Clin. Microbiol. **43:**1228–1233.
7. **Dos Vultos, T., et al.** 2008. Evolution and diversity of clonal bacteria: the paradigm of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One **3:**e1538–e1547.
8. **Ebrahimi-Rad, M., et al.** 2003. Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family. Emerg. Infect. Dis. **9:**838–845.
9. **Glynn, J. R., et al.** 2004. DNA fingerprint changes in tuberculosis: reinfec-tion, evolution, or laboratory error? J. Infect. Dis. **190:**1158–1166.
10. **Kapur, V., et al.** 1994. Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (rpoB) encoding the RNA polymerase beta subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. J. Clin. Microbiol. **32:**1095–1098.
11. **Morgan, M., S. Kalantri, L. Flores, and M. Pai.** 2005. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. BMC Infect. Dis. **5:** 62–70.
12. **Perri, B. R., et al.** 2011. *Mycobacterium tuberculosis* cluster with developing drug resistance, New York, New York, U.S.A., 2003-2009. Emerg. Infect. Dis. **17:**372–378.
13. **Schurch, A. C., et al.** 2011. Preferential deletion events in the direct repeat locus of Mycobacterium tuberculosis. J. Clin. Microbiol. **49:**1318–1322.
14. **Schurch, A. C., et al.** 2010. The tempo and mode of molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis* at patient-to-patient scale. Infect. Genet. Evol. **10:**108–114.
15. **Woods, G. L.** 2003. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae and other aerobic actinomycetes: approved standard. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.

American Journal of Infection Control 40 (2012) 9-10

Contents lists available at ScienceDirect

American Journal of Infection Control

journal homepage: www . ajicjournal . org

Major article

Outbreak or coincidental cases of tuberculosis? Genotyping provides the clue

Ricardo Casas-Fischer MD, PhD, MPH [a, *], Ana Penedo-Pallares MSc [b], Juan José Palacios-Gutierrez MD, PhD [b], Alfonso Moreno-Torrico MD [c]

[a] Preventive Medicine Service, Central University Hospital of Asturias, Oviedo, Spain

[b] Regional Mycobacteria Reference Unit, National Institute of Silicosis Building, Central University Hospital of Asturias, Oviedo, Spain [c] Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Central University Hospital of Asturias, Oviedo, Spain

Key Words:
Mycobacterium tuberculosis
Epidemiology Infection control Diagnostic techniques

We illustrate how genotyping of mycobacterial strains contributed to the discovery of an undetected outbreak of tuberculosis in a hospital ward, ruling out misleading assumptions of transmission chains. Genotyping should be taken into account in routine tests for the control of tuberculosis.

Copyright 2012 by the Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc.
Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Next to the former Eastern European countries, Spain has one of the highest incidence rates of tuberculosis (TB) in the European Union.[1,2] The new interferon gamma release assay (IGRA) technique has contributed to rule out better latent infections, which have led to their growing use in routine clinical practice.[3,4] New molecular techniques (eg, restriction fragment length polymorphism IS6110, spoligotyping, mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat) can identify the genotype of strains, which helps better define the epidemiology of the mycobacteria and facilitates decision making in the area of TB control.[5]

Here we examine the contribution of genotyping of Mycobacterium tuberculosis strains to the discovery of an undetected outbreak of tuberculosis in a hospital unit, revealing the true chains of transmission and ruling out the apparent but misleading epidemiologic links. We illustrate the usefulness of IGRA with an example in which the initially assumed index case could be discarded.

MATERIALS AND METHODS

Our study was carried out in TB patients who received care at the Central University Hospital of Asturias, a 1,200-bed third-level reference hospital in northern Spain. The hospital has a Regional Reference Unit of Mycobacteria, which receives strains from all public laboratories of the region. This hospital covers approxi-mately 35% of the Asturian population (1.1 million inhabitants), in whom the incidence rate of TB is close to 20 cases per 100,000 population.

The Microbiology, Radiology, and Pathology Services reported all TB cases to the Infection Control Team, which initiated treatment of cases and the epidemiologic investigation of contacts. The Microbiology Laboratory identified the isolated strains of mico-bacteria with chemiluminiscent DNA probes. Genotyping were done with spoligotyping and restriction fragment length poly-morphism IS6110. In Asturias, all genotypes identified since 2004 are included in a database.

Because several cases of TB appeared in the same month in the same ward, the study was broadened by searching the files of all of the TB cases diagnosed in this ward in 2009. Previous admissions of these cases were revised, and the genotypes of available strains were crossed with those included in the aforementioned database.

The investigation of contacts included anamnesis, tempor-ospatial relationship with the TB case, radiologic imaging, and the tuberculin test and/or IGRA test (QuantiFERON-TB Gold In-Tube; Cellestis, Valencia, CA). Chemoprophylaxis and anti-TB treatment were administered in accordance with approved standards.

Further data on the date of appearance of TB-like symptoms, date of diagnosis of TB, and dates and places of present and previous admissions of patients with TB, as well as the clinical characteristics of their roommates, were recorded. A contextualized analysis of these data was performed to uncover the epidemiologic links.

RESULTS

In June 2009, 3 cases of TB were diagnosed in one ward. Two of the isolated strains had different genotypes; the genotype of the third strain was unclear pending results of analysis. A fourth TB

Address correspondence to Ricardo Casas-Fischer, MD, PhD, MPH, Epidemiology Service, Department of Health and Social Welfare, c/ San Juan de la Cruz 28-3 , E-07051 Avila, Spain.
E-mail address: casasricardo@gmail.com (R. Casas-Fischer).
Conflict of interest: None to report.

0196-6553/$36.00 - Copyright 2012 by the Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc. Published by Elsevier Inc. All rights reserved. doi: 10.1016/j.ajic.2011.03.00

case, treated since April 2009, was admitted to the same ward in July. This patient's genotype, retrieved from the database, was different and unique. When the pending result showed the same genotype as in the first detected case, the initial assumption of a simple coincidence of different TB cases was invalidated. At the end of August, a fifth patient with respiratory TB was admitted in the ward, whose genotype of the isolated strain coincided with that of the 2 patients with the identical genotype. Now we had a cluster of 3 genetically related cases. A screen of our reference database of genotypes revealed another identical genotype, corresponding to a strain obtained in February 2009 from a urine sample from a patient with HIV.

An analysis of previous admissions revealed that 3 of our cluster of 4 patients shared the same ward during 7 days in February 2009, 2 of them in the same room, but none of these patients was under suspicion of TB, despite compatible symptoms. Nonverifiable epidemiologic links outside the hospital were found.

The screening of all diagnosed TB cases in the affected hospital unit at one point during 2009 revealed 2 Guinean women with identical genotypes, which were different from that of our cluster. Curiously, the contact investigation found that these 2 women lived in neighboring location and visited the same hairdresser.

None of the 17 exposed roommates of any of our TB cases demonstrated TB infection. One familiar contact became a TB converter. One staff member who was being treated with infliximab was suspected to be the index case, based on a positive tuberculin test and a dubious chest X-ray. But this suspicion proved to be unfounded after 2 IGRA tests were negative and her X-ray was determined to be non-TB-related.[6]

DISCUSSION

Our findings demonstrate that the identification of genotypes of isolated mycobacterial strains in patients with TB allows the discrimination between a simple coincidence of cases and a cluster based on evidence. Furthermore, the suspicion of TB in the presence of clinical signs (ie, unexplained febrile episodes or constitutional syndromes) occurred with substantial delay (between 6 days and 8 months in our series; median, 34 days). Radiologic signs of TB are not sufficiently taken into account in the differential diagnosis of TB. In 2 patients in our series, the detection of these signs did not prompt sample collection until 2 and 6 months later, respectively.[7] We appreciate a reduction in the suspicion index of TB in our center, especially in patients with immunosuppression and/or immigrants from countries with high TB rates, which allowed patients with undiagnosed TB to share the same room, as occurred in our case. All of our patients with TB had immunosuppression. In the affected ward, more than 25% of the 391 patients admitted during 2009 had a principal diagnosis associated with immunosuppression. In such a clinical context, when the preventive isolation of potentially contagious patients with TB is not logistically possible, at a minimum these patients should not be placed in rooms with immunosuppressed patients.

An earlier crossing of genotypes would have allowed us to establish the links more quickly.[8] The first case of our cluster was diagnosed in February 2009, and the second genetically related case was diagnosed in June, whereas the genotype crossing was not performed until October 2009.

The study of the epidemiologic transmission chain of our cases is ongoing. In fact, the case of a girl with TB and an identical genotype to that of our cluster appeared in February 2010. However, this patient has no epidemiologic link with the investigated cases, which leads us to think that the index case has yet to be discovered and is possibly circulating in our environment.

Acknowledgment

We thank Ángela Menéndez, María Josefa Rodríguez, Ángeles Díaz Escalada, Zulima Velasco, Isabel Ferrero, Beatriz Eyaralar Riera, Catherine Park, and other professionals of the Central University Hospital of Asturias and the Regional Health Department for their excellent technical assistance, translation, and other contributions.

References

1. European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance in Europe 2009. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2011. p. 35.
2. Rodríguez E, Hernández G, Villarrubia S, Díaz O, Tello O. Cases of tuberculosis reported to the National Epidemiological Surveillance Network. Spain, 2008. Weekly Epidemiological Bulletin. Bol Epidemiol Sem 2009;17:121-32.
3. de Perio M, Tsevat J, Roselle GA, Kralovic SM, Eckman MH. Cost-effectiveness of interferon gamma release assays vs tuberculin skin tests in health care workers. Arch Intern Med 2009;169:179-87.
4. Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A. Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active tuberculosis: a meta-analysis. Chest 2010;137:952-68.
5. Clark CM, Driver CR, Munsiff SS, Driscoll JR, Kreiswirth BN, Zhao B, et al. Universal tuberculosis genotyping in a tuberculosis control program: New York City, 2001-2003. Emerg Infect Dis 2006;12:719-24.
6. Mazurek GH, Jereb J, Vernon A, LoBue P, Goldberg S, Castro K, et al. Updated guidelines for using interferon gamma release assays to detect Mycobacterium tuberculosis infection-United States, 2010. MMWR Recomm Rep 2010;59(RR-5): 1-26.
7. Storla DG, Yimer S, Bjune GA. A systematic review of delay in the diagnosis and treatment of tuberculosis. BMC Public Health 2008;8:15.
8. Sintchenko V, Gilbert G. Utility of genotyping of Mycobacterium tuberculosis in the contact investigation: a decision analysis. Tuberculosis 2007;87:176-84.

Comunicaciones

IV Congreso Nacional del Laboratorio Clínico
Zaragoza, 20 -22 de Octubre de 2010

CERTIFICADO

Las Sociedades Científicas:

Asociación Española de Biopatología Médica (**AEBM**)
Asociación Española de Farmacéuticos Analístas (**AEFA**)
Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (**SEQC**)

Certifican que:

ARGÜELLES MENÉNDEZ, P; PENEDO PALLARES, A; CHAMORRO LÓPEZ, L; FERNÁNDEZ CODEJÓN, O; PALACIOS GASOS, M; PALACIOS GUTIÉRREZ, J

han presentado al IV Congreso Nacional del Laboratorio Clínico, celebrado en Zaragoza los días 20, 21 y 22 de Octubre de 2010, la comunicación número *333* titulada

PAPEL DE LAS NUEVAS TÉCNICAS DE PCR A TIEMPO REAL A PROPÓSITO DE UN CASO DE TUBERCULOSIS MULTIRRESISTENTE.

Imma Caballé Martín
Presidenta Comité de Congresos

Antonio Buño Soto
Presidente del Comité Científico

Zaragoza, 22 de Octubre de 2010

IV Congreso Nacional del Laboratorio Clínico
Zaragoza, 20 -22 de Octubre de 2010

CERTIFICADO

Las Sociedades Científicas:

Asociación Española de Biopatología Médica (**AEBM**)
Asociación Española de Farmacéuticos Analístas (**AEFA**)
Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (**SEQC**)

Certifican que:

ARGÜELLES MENÉNDEZ, P; GUTIÉRREZ FERNÁNDEZ, C; PENEDO PALLARES, A; CHAMORRO LÓPEZ, L; PALACIOS GASOS, M; PALACIOS GUTIÉRREZ, J

han presentado al IV Congreso Nacional del Laboratorio Clínico, celebrado en Zaragoza los días 20, 21 y 22 de Octubre de 2010, la comunicación número *201* titulada

PROBLEMAS DE INTERPRETACIÓN EN LOS ENSAYOS BASADOS EN LA LIBERACIÓN DE INTERFERÓN GAMMA (IGRAs)

Imma Caballé Martín
Presidenta Comité de Congresos

Antonio Buño Soto
Presidente del Comité Científico

Zaragoza, 22 de Octubre de 2010

XVI congreso asturpar

Sociedad Asturiana de Patología Respiratoria

LA PRESIDENTA DE ASTURPAR

CERTIFICA

QUE

ANA PENEDO PALLARES

Presentó Comunicación en el citado Congreso celebrado en Oviedo los días 17 y 18 de Marzo de 2011.

TÍTULO:

VALOR DIAGNÓSTICO DE LA PRUEBA MOLECULAR XPERT MTB/RIF EN MUESTRAS RESPIRATORIAS Y NO RESPIRATORIAS EN EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS

Hazael Jiménez Amador[1] , Juan José Palacios[2] , A Díaz Escalada[3] , S Vázquez López[2] , A Penedo Pallares[2] , M García Clemente[4] , A Fernández Tena[1] , Pere Casan Clará[4]

[1] *Hospital Universitario Central de Asturias. Instituto Nacional de Silicosis: Área de Pulmón* , [2] *Microbiología* ; [3] *Hospital Universitario Central de Asturias: Microbiología* ; [4] *Hospital Universitario Central de Asturias. Instituto Nacional de Silicosis.: Área de Pulmón*

Dra. Teresa González Budiño
Presidenta de ASTURPAR

D.E. M.ª Jesús Fernández Glez.
Secretaria de ASTURPAR

A27 DIAGNOSIS OF ACTIVE AND LATENT TUBERCULOSIS: NOVEL AND IMPROVED TECHNIQUES / Poster Discussion Session
/ Sunday, May 15/8:15 AM-10:45 AM / Room 601 (Street Level), Colorado Convention Center

Evaluation Of The Xpert Mtb/rif Test For Rapid Detection Of *Mycobacterium Tuberculosis*

M. G. Clemente[1], J. Palacios[1], A. Penedo[1], H. Jimenez[1], S. Vázquez[1], A. Díaz-Escalada[1], J. Garcia[2], F. López[1], A. Pando[1], P. Casan [1]

[1]Hospital Central de Asturias, Oviedo, Spain, [2]Hospital San Agustín, Avilés, Spain

Corresponding author's email: mgclemen@telefonica.net

OBJECTIVE: To determine the sensitivity and specificity of the Xpert MTB/RIF, an automated molecular test for Mycobacterium tuberculosis (MTB) and resistance to rifampin (RIF) as compared with the best available reference standard.

METHODS: This is a prospective study conducted during one year (from october 2009 to october 2010). The specimen of patients with pulmonary and extrapulmonary tuberculosis suspicion were subjected to microscopy with Ziehl-Nielsen staining and culture on solid medium (Löwenstein-Jensen) and liquid medium (BACTEC MGIT 960 and BACTalert 3D), and the Xpert MTB/RIF test. Patients were divided into two categories for analysis: those with smear and culture positive and those with smear-negative and culture positive. We analyse pulmonary and extrapulmonary specimen. Sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of the test were calculated.

RESULTS: Of the 1039 samples (930 patients) included in the analysis, 614 (59%) were pulmonary samples and 425 (41%) extrapulmonary samples. 81 samples were culture positive for Mycobacterium tuberculosis complex. Of then 76 samples were positive with Xpert MTB/RIF, 37 (3.6%) were smear and culture positive tuberculosis (34 pulmonary and 3 extrapulmonary) and 39 (3.8%) were smear negative and culture positive tuberculosis (24 pulmonary and 15 extrapulmonary) . Five samples were smear negative culture positive and Xpert MTB/RIF negative. The overall sensitivity test for all samples (pulmonary and extrapulmonary) was 94% (specificity 100%) with VPP 100% and VPN 99.4% (prevalence 20/100.000). The overall sensitivity test was 100% for smear and culture positive samples(specificity: 100%) and 89% for smear negative and culture positive samples (specificity 100%). In respiratory specimen the sensitivity was 100% for smear and positive culture (specificity 100%) and 92.3% for smear negative and culture positive (specificity 100%). In extrapulmonary samples the sensitivity was 100% for smear and culture positive (specificity 100%) and 83.3% for smear negative and culture positive (specificity 100%). In 6 patients the test detected rifampin resistance , 5 of them discrepant on phenotypic testing.

CONCLUSION:

1.- The sensitivity and specificity of Xpert MTB/RIF were very high in pulmonary and extrapulmonary samples.

2.- The test is highly sensitive in patients with smear negative positive culture and decrease delays in diagnosis in this group of patients 3.- The rifampin resistance detected in the test not always is concordant with phenotypic testing.

This abstract is funded by: None

Otros

Emerg Infect Dis. 2011 December; 17(12): 2393–2395. PMCID: PMC3311187
doi: 10.3201/eid1712.101476

Humans as Source of *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Cattle, Spain

Beatriz Romero, Sabrina Rodríguez, Javier Bezos, Rosa Díaz, M. Francisca Copano, Isabel Merediz, Olga Mínguez, Sergio Marqués, Juan J. Palacios, Darío García de Viedma, José Luis Sáez, Ana Mateos, Alicia Aranaz, Lucas Domínguez, and Lucía de Juan.

To the Editor: *Mycobacterium tuberculosis* is the main causative agent of tuberculosis in humans. However, little attention has been paid to its transmission from humans to animals. We report *M. tuberculosis* infections in 3 cattle farms in Spain. The epidemiologic investigation traced humans as the source of infection, with 1 of the strains showing multidrug resistance.

Recent studies have reported isolation of *M. tuberculosis* in cattle with prevalences of 4.7%–30.8% in African and Asian countries (*1–3*). In cattle, this infection occurs in countries with the highest incidence of human tuberculosis in the world. In Europe, only 14 cases of *M. tuberculosis* infection have been described in 3 eastern countries since implementation of eradication programs (*4,5*). The only reported cases of *M. tuberculosis* in cattle in western Europe were described in Great Britain and date back to the 1950s (*6*).

During 2007–2009, three cases of tuberculosis caused by *M. tuberculosis* were detected in 3 unrelated cattle farms, 2 of them free of tuberculosis (farms 1 and 2). As part of the surveillance system of bovine tuberculosis, a pool of tissue samples from each cow (respiratory lymph nodes and lung) were homogenized with sterile distilled water, and culture was carried out by the BACTEC mycobacteria growth indicator tube 960 system (Beckton Dickinson, Madrid, Spain). Members of the *M. tuberculosis* complex were identified and genotyped by direct variable repeat spacer olignucleotide typing and mycobacterial interspersed repetitive unit–variable number tandem repeat (MIRU-VNTR) typing (*7*).

The 3 *M. tuberculosis*–infected animals were <9 months of age (Table). As described (*6*), the possibility of infection in young animals could be more probable than infection in older cows.

M. tuberculosis–infected animals from farms 1 and 3 were detected by the intradermal tuberculin test (Table). The animal without immunologic response (farm 2) was detected because an *M. bovis* infection was confirmed in the herd, and all animals were slaughtered. Confirmation of infection by culture without immunologic response is rare, although the high sensitivity of the mycobacteria growth indicator tube system could detect a low bacterial load in the initial stages of infection. Recent implementation of liquid systems in animal health laboratories has enabled detection of *M. tuberculosis* when it is compared with results using only conventional methods. Moreover, no tuberculosis-compatible lesions were observed in the 3 animals, similar to previous studies (*6*). On the basis of these facts, *M. tuberculosis* transmission was not detected among cattle in the following intradermal tuberculin tests.

Table

Relevant information about *Mycobacterium tuberculosis* infection in 3 cattle farms in Spain*

Variable	Farm 1	Farm 2	Farm 3
Cattle herd			
Nº Animals	6	54	>200
Production	Beef	Beef	Dairy
Previous status	TB free	TB free	Non-TB free
Nº reactors	1	31	12
M. tuberculosis infectious in cattle			
Year of isolation	2007	2008	2009
Age, mo	9	4	3
IDTB/interferon-γ	Pos/Not determined	Neg/neg	Pos/not determined
TB-compatible lesion	No	No	No
Spoligotyping profile	SIT2537	SIT1564	SIT58
MIRU-VNTR profile†	253533233433236252211423	3′523342324554572512134 23	254343243232325262213423
Co-infection with other mycobacteria	Yes (*M. avium* subsp. *hominissuis*)**	Yes (*M. bovis*)	No
M. tuberculosis infection in human			
Active tuberculosis	Yes	Yes	Yes
Spoligotyping profile	SIT2537	Not available	SIT 58
MIRU-VNTR profile†	253533233433236252211423	3′523342324554572512134 23	254343243232325262213423
Origin	Spain	Eastern Europe	Spain

*TB, tuberculosis; IDTB, intradermal tuberculin tested according to the European Council Directive 64/432/EEC; pos, positive; neg, negative; MIRU-VNTR, mycobacterial interspersed repetitive unit–variable number tandem repeat.
†MIRU-VNTR profile on the basis of the 24 MIRU-VNTR loci (7).** Co-infection in the same animal.

Co-infection with other mycobacteria (*M. avium* subsp. *hominissuis*) was found in the same animal from farm 1 (Table). This co-infection suggested the immunocompromised status of the animal and hence a high susceptibility to *M. tuberculosis* infection. Moreover, *M. bovis* was isolated from 52% (16/31) of all animals from farm 2 that showed a positive reaction to the intradermal tuberculin skin test, making remarkable the absence of co-infection with *M. bovis* in the *M. tuberculosis*–infected animal. Therefore, the lack of *M. tuberculosis* transmission within this herd contrasts with the *M. bovis* dissemination.

The veterinary services reported these findings to the National Public Health System, and an epidemiologic investigation was conducted on the cattle farms to determine the source of infection. In all cases, staff of the farms had active tuberculosis (Table). Three different strains were characterized: SIT2537 (octal code 777617777720771), 253533233433236252211423 (farm 1); SIT1564, 3′523342324554572512134 23 (farm 2); and SIT58, 254343243232325262213423 (farm 3) (Table). The MIRU-VNTR pattern and spoligotype are shared by Spanish human and cattle isolates from farm 1; SIT2537 is an uncommon profile that has been detected in Brazil and Spain (according to the SITVIT2 database). The human strain showed multidrug resistance to isoniazid, rifampin, and ethionamide. In cattle and human isolates, genes associated with isoniazid and rifampin resistance were studied (8) and *rpoB* analysis confirmed rifampin resistance (Ser531Leu). In farm 2, the origin of the farm worker was eastern Europe and the cattle isolate showed an SIT1564 profile, which is found only in 6 human isolates in the SpolDB4 database, all from Poland, Bulgaria, and Russia. On farm 3, human and cattle isolates from Spain shared identical spoligotype and MIRU-VNTR patterns. The profile SIT58 is frequent in Spain (9) and other countries with historical links to Spain, mainly the south American countries (79/114 according to SpolDB4).

A well-designed program for eradicating bovine tuberculosis helps to detect *M. tuberculosis* infection by immune response or by bacteriologic culture. The use of liquid systems and results of epidemiologic studies (Spanish Database of Animal Mycobacteriosis, mycoDB.es) (S. Rodríguez, unpub. data) are recommended for prompt confirmation of the *M. tuberculosis* complex infection and for enhancing the sensitivity of culture. In addition, the Spanish Ministry of Environment, Rural and Marine Affairs has reinforced the need to improve cooperation between human and animal health systems to minimize the risk for *M. tuberculosis* complex transmission from animals to humans or vice versa and to control infection in all susceptible animal species (10).

Acknowledgments

We thank L. Carbajo, J. Carpintero, E. Fernández, and L.M. Álvarez for their continuous encouragement; F. Lozano, N. Moya, A. Gutiérrez, J. Gimeno, A. Penedo, A. Menéndez, C. Martínez, and J.A. Anguiano for technical help; R. Daza and M.S. Jiménez for providing the human strains and related data; Nalin Rastogi for comparison of spoligotyping results with the SITVIT2 proprietary database; and M. Gilmour for careful revision of the manuscript.

This research was funded by project TB-STEP FP7-KBBE-2007-212414 of the European Union and by the Spanish Ministry of the Environment, and Rural and Marine Affairs and partially by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS S09/02205). B.R. received a research contract funded by Comunidad de Madrid (IV regional framework program of research and technological innovation 2005−2008).

Footnotes

Suggested citation for this article: Romero B, Rodríguez S, Bezos J, Díaz R, Copano MF, Merediz I, et al. Humans as source of *Mycobacterium tuberculosis* infection in cattle, Spain [letter]. Emerg Infect Dis [serial on the Internet]. 2011 Dec [*date cited*]. http://dx.doi.org/10.3201/eid1712.101476

References

1. Fetene T, Kebede N, Alem G Tuberculosis infection in animal and human populations in three districts of western Gojam, Ethiopia. Zoonoses Public Health. 2011;58:47–53PubMeddoi:10.1111/j.1863-2378.2009.01265.x. [PubMed]
2. Chen Y, Chao Y, Deng Q, Liu T, Xiang J, Chen J, et al. Potential challenges to the Stop TB Plan for humans in China; cattle maintain *M. bovis* and *M. tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb). 2009;89:95–100. doi: 10.1016/j.tube.2008.07.003. [PubMed] [Cross Ref]
3. Prasad HK, Singhal A, Mishra A, Shah NP, Katoch VM, Thakral SS, et al. Bovine tuberculosis in India: potential basis for zoonosis. Tuberculosis (Edinb). 2005;85:421–8. doi: 10.1016/j.tube.2005.08.005. [PubMed] [Cross Ref]
4. Pavlik I, Trcka I, Parmova I, Svobodova J, Melicharek I, Nagy G, et al. Detection of bovine and human tuberculosis in cattle and other animals in six central European countries during the years 2000–2004. Vet Med Czech. 2005;50:291–9 [cited 2011 Oct 24]. http://www.vri.cz/docs/vetmed/50-7-291.pdf.
5. Pavlik I, Ayele WY, Parmova I, Melicharek I, Hanzlikova M, Körmendy B, et al. *Mycobacterium tuberculosis* in animal and human population in six Central European countries during 1990−1999. Vet Med Czech. 2003;48:83-89 [cited 2011 Oct 24]. http://www.vri.cz/docs/vetmed/48-4-83.pdf.
6. Lesslie IW Tuberculosis in attested herds caused by the human type tubercle bacillus. Vet Rec. 1960;72:218–24.
7. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2006;44:4498–510. doi: 10.1128/JCM.01392-06. [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
8. Romero B, Aranaz A, de Juan L, Álvarez J, Bezos J, Mateos A, et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates with the same spoligotyping profile as isolates from animals. J Clin Microbiol. 2006;44:3405–8. doi: 10.1128/JCM.00730-06. [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
9. García de Viedma D, Bouza E, Rastogi N, Sola C Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in Madrid and identification of two new families specific to Spain-related settings. J Clin Microbiol. 2005;43:1797–806. doi: 10.1128/JCM.43.4.1797-1806.2005. [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
10. Ministerio de Medio Ambiente y Rural y Marino. Discussion conference about the eradication of bovine tuberculosis [in Spanish]. Santander, 2010 Jun 29−30, Spain [cited 2011 Oct 24]. http://www.mapa.es/es/ganaderia/pags/eventos_presidencia/jornada_tuberculosis_bovina.htm.