

UNIVERSIDAD POLITECNICA DE VALENCIA

Tesis Doctoral



**Genotipificación de *Mycobacterium tuberculosis*
complex mediante herramientas moleculares**

por

ANA PATRICIA JIMENEZ ARIAS

Directores

Dra. MARIA DEL REMEDIO GUNA SERRANO

Responsable Sección de Micobacterias

Servicio de Microbiología. Consorcio Hospital General Universitario. Valencia. España.

MARCELO GRIJALVA SILVA M.D. Ph.D.

Jefe del Laboratorio de Biotecnología Humana

Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE (Ecuador)

Valencia, Octubre 2015

Dra. MARIA DEL REMEDIO GUNA SERRANO, Responsable de la Sección de Micobacterias del Servicio de Microbiología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

CERTIFICA

Que ANA PATRICIA JIMENEZ ARIAS, ha realizado bajo su dirección la Tesis Doctoral que lleva por título " Genotipificación de *Mycobacterium tuberculosis* complex mediante herramientas moleculares" y autorizan la presentación de la Tesis Doctoral la cual se adecúa a los requisitos formales, metodológicos y de contenido, de acuerdo con la normativa publicada por la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia.

Y para que conste a los efectos oportunos lo firma en Valencia a 27 de octubre de 2015.



Fdo. **Dra. MARIA DEL REMEDIO GUNA SERRANO**

MARCELO GRIJALVA SILVA M.D. Ph.D. Jefe del Laboratorio de Biotecnología Humana del Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE (Ecuador) por la presente:

CERTIFICA

Que ANA PATRICIA JIMENEZ ARIAS, ha realizado bajo su dirección la Tesis Doctoral que lleva por título "Genotipificación de *Mycobacterium tuberculosis* complex mediante herramientas moleculares" y autorizan la presentación de la Tesis Doctoral la cual se adecúa a los requisitos formales, metodológicos y de contenido, de acuerdo con la normativa publicada por la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia.

Y para que conste a los efectos oportunos lo firma en Valencia a 27 de octubre de 2015.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Marcelo Grijalva Silva', with a stylized flourish at the end.

Fdo. **MARCELO GRIJALVA SILVA M.D. Ph.D.**

JOSE GADEA VACAS, profesor del Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia

CERTIFICA

Que ANA PATRICIA JIMENEZ ARIAS, ha realizado bajo su tutoría la Tesis Doctoral que lleva por título " Genotipificación de *Mycobacterium tuberculosis* complex mediante herramientas moleculares" y autorizan la presentación de la Tesis Doctoral la cual se adecúa a los requisitos formales, metodológicos y de contenido, de acuerdo con la normativa publicada por la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia.

Y para que conste a los efectos oportunos lo firma en Valencia a 27 de octubre de 2015.



Fdo. JOSE GADEA VACAS

DEDICATORIA

*A mi Madre
quien me regaló la vida
y hoy brilla en lo más alto del firmamento*

*A mis hijos Anthony y Jannis
por darle sentido a mi vida y llenarla de inmensa felicidad*

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Politécnica de Valencia en la persona del profesor José Gadea, mi tutor, por su don de gente y ayuda oportuna.

Al Servicio de Microbiología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia en la persona de Dra. Concepción Gimeno por confiar en mí y darme las facilidades para que este proyecto se consolide.

A mis Directores: María del Remedio Guna y Marcelo Grijalva por su orientación, formación académica y su tiempo invaluable dedicado a este trabajo.

A mis amigas Reme, María José y Elena, mujeres excepcionales, que compartieron momentos muy importantes de mi vida y ocupan un lugar especial en mi corazón; gracias por su cariño.

Al Dr. Rafael Borrás Salvador, por el interés puesto en esta investigación, por sus conocimientos, su predisposición y valioso tiempo dedicado a este trabajo de investigación, mi gratitud y respeto.

A Manolo Matas por su ayuda desinteresada, a mis compañeros del Servicio de Microbiología del HGUV por acogerme y estar pendientes de mí, gracias Fernando, David, Nuria, Merche, Loli, Luis, Laura, Rafa, Sandra, Alicia, Mónica,... mi cariño para ustedes.

Al Laboratorio de Microbiología del Hospital Carlos Andrade Marín (Quito) en las personas de: Dr. Ramiro Salazar, Dr. Fernando Romero, Lcda. María Leonor Erazo y al Laboratorio Clínico del Hospital Alli Causai (Ambato) en las personas de Dr. Carlos Rojas Andrade, Dra. Jenny Arias, Dra. Yolanda Arias y Tcnlgo. Cecilia Céspedes quienes confiaron en el proyecto y permitieron el acceso a los ceparios de Mycobacterias, gracias por el apoyo incondicional.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE por apoyar en el proceso de formación de posgrado y conceder las facilidades para que se realice esta tesis doctoral en los

laboratorios de Biotecnología Humana del Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura.

A la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología SENESCYT por impulsar la formación del talento humano ecuatoriano y financiar mis estudios de Doctorado mediante la entrega de una beca - Academia.

A mi Mami, por los ejemplos de vida, entrega, fortaleza, coraje y lucha diaria, gracias por el amor que me diste.

A mi querida familia, mis hermanos Stephany y Rodrigo, mi papá, mis tíos Jaime, Jenny, Yoli, Ceci, mis primos en especial a Marbel por su preocupación y apoyo incondicional, a mi abuelita por su cariño, a todos mis infinitas gracias por ser mi soporte, por cuidar con amor a mis hijos durante mi ausencia, por confiar en mí y animarme a seguir adelante.

A mis amigos por su cariño, apoyo y preocupación. A mi amiga y confidente Kary, por ser la palabra de aliento y el abrazo cálido que me impulsa a seguir caminando, gracias!

A mis preciosos hijos Anthony y Jannis gracias por ese infinito amor, por sus caricias, ocurrencias, juegos y sonrisas que han sido el aliciente para no decaer en esta etapa de formación donde he cumplido diversos roles intentando dar lo mejor de mí.

Gracias mis pequeños por crecer junto a este sueño del que ahora podemos disfrutar juntos, gracias por su paciencia a lo largo de estos cinco años. Les amo con mi vida.

Gracias a todos !

RESUMEN

En los últimos años se han desarrollado diversas técnicas de genotipificación para aislados de *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) que han demostrado tener un alto poder discriminatorio. En este estudio, tras identificación de las cepas seleccionadas al nivel de especie mediante la técnica comercial GenoType® MTBC, se ha evaluado la utilidad de la técnica simplificada del Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLPs) y la técnica de Unidades Repetitivas Intercaladas Micobacterianas (MIRU-15). Se analizaron un total de 131 aislados clínicos de los cuales 68 aislados fueron recolectados en Ecuador, provenientes tanto del Laboratorio Clínico del Hospital Alli Causai ubicado en la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua como del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Carlos Andrade Marín ubicado en la ciudad capital Quito, provincia de Pichincha. Los 63 aislados restantes fueron recolectados en España y pertenecían colección de microorganismos de los Servicios de Microbiología del Consorcio Hospital General Universitario y Hospital Clínico Universitario de la ciudad de Valencia, provincia de Valencia. De éstos aislados, 126 fueron identificados por métodos convencionales y moleculares como MTBC, correspondientes a 106 pacientes. La cepa control *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177 también fue identificada como tal mediante este método.

La técnica AFLPs permitió agrupar a las cepas en doce patrones (P1 a P8, P10, P12, P13, P14), de los cuales los más prevalentes fueron los patrones P1 y P2 con 77 (61,1%) y 27 (21,4%) aislados respectivamente, lo que supone el 82,5% del total de los mismos. Le siguieron en frecuencia el patrón P5 con 5 (3,9%) aislados, los patrones P3, P4 y P6 agruparon a 3 aislados cada uno (2,4%), los patrones P8 y P12 con 2 aislados (1,6%) y finalmente los patrones P7, P10, P13 y P14 con 1 aislado cada uno (0,8%). La cepa control *M. tuberculosis* ATCC 25177, mostró un perfil de restricción que no permitió su inclusión en ninguno de los patrones descritos. El poder discriminatorio del método (HGDI) fue de 0,5812 frente a 0,9843 de la técnica MIRU-15, que agrupó a 69 cepas (54,8%) en 20 complejos clonales y 57 patrones únicos (45,2%). Para el caso de España, las cepas estuvieron relacionadas en su mayoría con el linaje 4 o Euro-Americano que incluye: Cammeroon (1,59%), Haarlem (36,51%), S (31,75%), y LAM (19,05%); el linaje 6 o West Africa I (9,53%), el linaje 1 o EIA (1,59%), Para el caso de Ecuador las cepas estaban relacionadas con el linaje 4: Haarlem (42,86%), S (33,33%), y LAM (22,22%) y el linaje 2 Beijing (1,59%) originario de Asia. La técnica MIRU-VNTR (15 loci) demostró ser un sistema estable, reproducible y con un poder discriminatorio alto en comparación con AFLPs lo que permitiría emplearlo para realizar estudios poblacionales prospectivos con la finalidad de contribuir a los programas de Salud Pública para el control de la Tuberculosis (TB).

Palabras clave: AFLP, MIRU-VNTR, genotipificación, *Mycobacterium tuberculosis*, linaje

ABSTRACT

In the last years, various genotyping techniques were developed for isolation of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) that has demonstrated a high discriminatory power. In this study, after the identification of selected strains at level of species by Genotype® MTBC technique, we evaluated the profit of the simplified amplified-fragment Length Polymorphism technique (AFLPs) and the Mycobacterial Interspersed Repetitive Units technique (MIRU-15). A total of 131 mycobacterium tuberculosis isolates were analyzed, 68 isolates were collected in Ecuador, from the Clinical Laboratory of Hospital Alli Causai located in city of Ambato, and the Laboratory of Bacteriology in Carlos Andrade Marín Hospital located in the capital city Quito. The remaining 63 isolates were harvested in Spain and belong to microorganism's collection of Microbiology Services of Consorcio Hospital General Universitario and Hospital Clínico Universitario of the city of Valencia. Among these isolates, 126 were identified by conventional methods such as molecular MTBC, corresponding to 106 patients. The *Mycobacterium tuberculosis* control strain ATCC 25177 was also identified as such by this method.

The AFLPs technique allowed as to group the strains in twelve patterns (P1 to P8, P10, P12, P13, P14), of which the most prevalent were patterns P1 with 77 (61.1%) and P2 with 27 (21, 4%) isolates, representing 82.5% of the same. These were followed by the pattern P5 with 5 (3.9%) isolates, the patterns P3, P4 and P6 grouped 3 isolates each one (2.4%), the patterns P8 and P12 with 2 isolates (1.6%) and finally the patterns P7, P10, P13 and P14 with 1 isolated each one (0.8%). The control strain *M. tuberculosis* ATCC 25177, showed a restriction profile that prevented their inclusion in any of the patterns described. The discriminatory power of the Hunter-Gaston discriminatory index (HGDI) method was 0.5812 against to 0.9843 of the MIRU-15 technique, which grouped 69 strains (54.8%) in 20 clonal complex and 57 unique patterns (45.2%). In the case of Spain, the strains were related mostly to the lineage 4 or Euro-American including: Cammeroon (1.59%), Haarlem (36.51%), S (31.75%), and LAM (19.05%); the lineage 6 or West Africa I (9.53%), the lineage 1 or EIA (1.59%) In the case of Ecuador the strains were related to the lineage 4: Haarlem (42.86%), S (33.33%) and LAM (22.22%) and Beijing lineage 2 (1.59%) from Asia. The MIRU-VNTR Variable-Number Tandem Repeats (15 loci) technique proved to be a stable system, reproducible and high discriminatory power in comparison with AFLPs system, allowing the use of it to conduct prospective population studies with the aim of contributing to the public health programs to control Tuberculosis (TB).

Keywords: AFLPs, MIRU-VNTR, genotyping, *Mycobacterium tuberculosis*, lineage

RESUM EN VALENCIÀ

En els últims anys s'han desenvolupat diverses tècniques de genotipificació per aïllats de *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) que han demostrat tenir un alt poder discriminatori. En aquest estudi, després de la identificació de les soques seleccionades al nivell d'espècie mitjançant la tècnica comercial GenoType® MTBC, s'ha avaluat la utilitat de la tècnica simplificada del Polimorfisme de longitud de fragments amplificats (AFLPs) i la tècnica d'Unitats repetitives Intercalades micobacterianes (Miru-15). Es van analitzar un total de 131 aïllats clínics dels quals 68 aïllats van ser recol·lectats a Equador, provinents tant del Laboratori Clínic de l'Hospital Ali Causai situat a la ciutat d'Ambato, província de Tungurahua com del Laboratori de Bacteriologia de l'Hospital Carlos Andrade Marín ubicat a la ciutat cabdal Quito, província de Pichincha. Els 63 aïllats restants van ser recol·lectats a Espanya i pertanyien a la col·lecció de microorganismes dels Serveis de Microbiologia del Consorci Hospital General Universitari i Hospital Clínic Universitari de la ciutat de València, província de València. D'aquests aïllats, 126 van ser identificats per mètodes convencionals i moleculars com MTBC, corresponents a 106 pacients. La soca control *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177 també va ser identificada com a tal mitjançant aquest mètode.

La tècnica AFLPs va permetre agrupar les soques en dotze patrons (P1 a P8, P10, P12, P13, P14), dels quals els més prevalents van ser els patrons P1 i P2 amb 77 (61,1%) i 27 (21, 4%) aïllats respectivament, fet que suposa el 82,5% del total dels mateixos. El van seguir en freqüència el patró P5 amb 5 (3,9%) aïllats, els patrons P3, P4 i P6 van agrupar a 3 aïllats cadascun (2,4%), els patrons P8 i P12 amb 2 aïllats (1,6%) i finalment els patrons P7, P10, P13 i P14 amb 1 aïllat cadascun (0,8%). La soca control *M. tuberculosis* ATCC 25177, va mostrar un perfil de restricció que no va permetre la seva inclusió en cap dels patrons descrits. El poder discriminatori del mètode (HGDI) va ser de 0,5812 enfront de 0,9843 de la tècnica MIRU-15, que va agrupar a 69 soques (54,8%) en 20 complexos clonals i 57 patrons únics (45,2%). Per al cas d'Espanya, les soques van estar relacionades majoritàriament amb el llinatge 4 o Euro-Americà que inclou: Cammeroon (1,59%), Haarlem (36,51%), S (31,75%), i LAM (19,05%); el llinatge 6 o West Africa I (9,53%), el llinatge 1 o EIA (1,59%), Pel cas de l'Equador les soques estaven relacionades amb el llinatge 4: Haarlem (42,86%), S (33,33%), i LAM (22,22%) i el llinatge 2 Beijing (1,59%) originari d'Àsia. La tècnica Miru-VNTR (15 loci) va demostrar ser un sistema estable, reproduïble i amb un poder discriminatori alt en comparació amb AFLPs, el que permetria emprar-lo per realitzar estudis poblacionals prospectius amb la finalitat de contribuir als programes de salut pública per al control de la Tuberculosi (TB).

Paraules clau: AFLP, MIRU-VNTR, genotipificació, *Mycobacterium tuberculosis*, llinatge

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Aspectos epidemiológicos de la Tuberculosis.....	3
1.2	Aspectos biológicos y estructurales de las Micobacterias: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ..	6
1.3	Patogenia, inmunidad y manifestaciones clínicas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9
1.4	Diagnóstico.....	12
1.4.1	Diagnóstico Inmunológico.....	12
1.4.2	Diagnóstico Microbiológico.....	14
1.4.3	Identificación molecular.....	19
1.5	Tratamiento.....	22
1.6	Epidemiología molecular.....	23
1.6.1	Técnicas moleculares	24
1.7	Filogenia global de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	30
2.	OBJETIVOS.....	35
2.1	Objetivo general.....	38
2.2	Objetivos específicos.....	38
3.	MATERIAL Y METODOS	39
3.1	Origen del material biológico.....	41
3.2	Mantenimiento y recuperación de los aislados.....	42
3.3	Identificación molecular de aislados a nivel de especie (GenoType® MTBC).....	43
3.3.1	Extracción de ADN:.....	43
3.3.2	Amplificación:.....	43
3.3.3	Hibridación:	44
3.4	Identificación del Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> mediante BD MGIT TBc Identification Test.	45
3.5	Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados: AFLP.....	47
3.5.1	Preparación de la biomasa y lisis celular.....	47
3.5.2	Extracción de ADN genómico	48
3.5.3	Cuantificación de la concentración de ADN.....	48
3.5.4	Restricción enzimática.....	48
3.5.5	Preparación de adaptadores de doble cadena	49

3.5.6	Ligación de los adaptadores al ADN digerido e inactivación de la T4 ligasa	49
3.5.7	Reacción en cadena de la polimerasa	49
3.5.8	Electroforesis y visualización de los fragmentos amplificados	50
3.5.9	Análisis e interpretación.....	50
3.5.10	Estudio del poder discriminatorio de la técnica.....	51
3.6	ENSAYO CON MIRUs – VNTR	52
3.6.1	Reacción en cadena de la Polimerasa	53
3.6.2	Electroforésis y visualización de los fragmentos amplificados	54
3.6.3	Análisis e Interpretación.....	55
3.6.4	Estudio del poder discriminatorio de la técnica.....	56
4.	RESULTADOS	59
4.1	Descripción de la población en estudio	61
4.1.1	Año de Aislamiento:	61
4.1.2	Género:.....	61
4.1.3	Edad:.....	62
4.1.4	Origen de las muestras:.....	63
4.2	Identificación fenotípica de los aislados clínicos.....	64
4.3	Identificación molecular mediante Genotype® MTBC.....	65
4.4	Identificación mediante ensayo BD MGIT TBc	67
4.5	Estandarización de Técnicas de Genotipificación	68
4.5.1	Análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP).....	68
4.5.2	MIRU-VNTR	76
5.	DISCUSION.....	101
6.	CONCLUSIONES	115
7.	BIBLIOGRAFIA.....	121

ABREVIATURAS

TB	Tuberculosis
MNT	Micobacterias no tuberculosas
MTBC	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS/WHO	Organización Mundial de la Salud
TB-MDR	Tuberculosis multidrogorresistente
TB-XDR	Tuberculosis extremadamente-resistente
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
MSP	Ministerio de Salud Pública
ONGs	Organizaciones no gubernamentales
DyA	Desarrollo y Autogestión
RIOS	Red Internacional en Organizaciones en Salud
CECOMET	Centro de Epidemiología Comunitaria y Medicina Tropical
DOTS	Tratamiento directamente observado
INSPI	Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública
G	Guanosina
C	Citosina
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
LAM	Lipoarabinomanano
PPD	Derivados proteicos purificados
EEA1	Antígeno endosomal específico 1
IL-12	Interleucina 12
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
NK	Células <i>natural killer</i>
TH1	Linfocitos T colaboradores
IFN- γ	Interferón gama
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PT	Prueba de la tuberculina
IGRA	Interferon gamma release assay
ESAT-6	Early secretory antigen target 6
CFP-10	Cultura filtrate protein 10

CDC	Centers for Disease Control and Prevention
BAAR	Bacilos ácido alcohol resistentes
LED	<i>Light-emitting diode</i>
AAN	Amplificación de ácidos nucleicos
VPP	Valor predictivo positivo
MPT64	Fracción proteica micobacteriana
ILT	Infección latente tuberculosa
DAT	Drogas antituberculosas
R	Rifampicina
H	Isoniacida
Z	Pirazinamida
E	Etambutol
FDA	Food and Drug Administration
RFLP-IS6110	Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción de la secuencia de inserción IS6110
AFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados
DR	Direct repeats
SSRs	Secuencias repetitivas cortas
VNTR	Repeticiones en tándem de número variable
ERICs	Secuencias consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas
IRUs	Unidades repetitivas intergénicas
REPs	Secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas
PUs	Unidades palindrómicas
MIRUs	Secuencias repetitivas intercaladas micobacterianas
VNTR	Repeticiones en tándem de número variable
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
SNPs	Polimorfismo de nucleótido simple
LPSs	Polimorfismo de Secuencia Larga
AP	Fosfatasa alcalina
HYP	Tampón de hibridación
STR	Solución de lavado astringente
TE	Tris-EDTA
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
TBE	Tris-borato-EDTA

HGDI	Índice discriminatorio de Hunter Ganston
EAI	Linaje East African-Indian
LAM	Linaje Latinoamérica y Mediterráneo
CC	Complejo clonal

LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1. Incidencia mundial estimada de Tuberculosis 2013
- Figura 2. Casos nuevos de Tuberculosis MDR 2013
- Figura 3. Estructura de la pared celular micobacteriana
- Figura 4. Interpretación de los resultados del Test de Identificación BD MGIT TBc
- Figura 5. Posición de los 41 loci MIRU en el cromosoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv
- Figura 6. Esquema de la evolución de *M. tuberculosis* complex
- Figura 7. Distribución de los linajes de *M. tuberculosis* a nivel mundial
- Figura 8. Mapa de Ecuador indicando las ubicaciones de dos ciudades Quito y Ambato
- Figura 9. Mapa de España indicando la ubicación de la ciudad de Valencia
- Figura 10. Interpretación del ensayo GenoType® MTBC
- Figura 11. Esquema de la realización de la técnica (BD)
- Figura 12. Patrones AFLP para *M. tuberculosis* complex
- Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los amplicones obtenidos para el MIRU 40
- Figura 14. Número de aislados clínicos por año de obtención
- Figura 15. Distribución de los aislados clínicos por género
- Figura 16. Distribución de los aislados clínicos por grupos etarios
- Figura 17. Origen de las muestras clínicas
- Figura 18. Cultivo Löwenstein- Jensen – cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.
- Figura 19. Lectura e interpretación de la técnica GenoType® MTBC :
Identificación de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG
- Figura 20. Lectura e interpretación de la técnica GenoType® MTBC:
Identificación de *M. tuberculosis* y *M. africanum*
- Figura 21. Ensayo BD MGIT TBc para la cepa control ATCC 25177
- Figura 22. Ensayo BD MGIT TBc para cepa ECU 6
- Figura 23-24-25. Perfiles de restricción AFLP obtenidos con el primer XP-G para distintos aislados clínicos de *M. tuberculosis*
- Figura 26. Diferentes patrones obtenidos con el primer XP-G

- Figura 27. Distribución de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en España en los patrones AFLP
- Figura 28. Dendograma de homología resumido obtenido con el primer XP-G
- Figura 29. Distribución de patrones AFLP obtenidos de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en Ecuador
- Figura 30. Distribución de patrones de restricción por cepa y por origen (Ecuador y España)
- Figura 31. Mirutipo para cepas control H37Ra y H37Rv
- Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU 4
- Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU 26
- Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU 40
- Figura 35. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU 10
- Figura 36. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU 16
- Figura 37. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU 31
- Figura 38. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU 42
- Figura 39. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU 43
- Figura 40. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU ETR A
- Figura 41. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU 47
- Figura 42. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU 52
- Figura 43. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU 53
- Figura 44. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU Qub1 1b
- Figura 45. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU 1955
- Figura 46. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU QUB-26
- Figura 47. Dendograma UPGMA, mirutipo basado en 15 loci MIRU-VNTR y patrones de sensibilidad de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de Ecuador
- Figura 48. Cálculo de la diversidad alélica para los 15 loci miru-vntr en aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* ecuatorianos
- Figura 49. Árbol de mínima expansión construido a partir de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* ecuatorianos
- Figura 50. Distribución de los aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* ecuatorianos en ocho complejos clonales
- Figura 51. Dendograma UPGMA, mirutipo basado en 15 loci MIRU-VNTR y patrones de sensibilidad de aislados clínicos de *Mycobacterium*

tuberculosis provenientes de España

- Figura 52. Cálculo de la diversidad alélica para los 15 loci miru-vntr en aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* españoles
- Figura 53. Árbol de mínima expansión construido a partir de aislados clínicos *Mycobacterium tuberculosis* españoles (la diferencia máxima entre complejos clonales es de 2 loci)
- Figura 54. Distribución de los aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* españoles en ocho complejos clonales
- Figura 55. Dendograma UPGMA, mirutipo basado en 15 loci MIRU-VNTR y patrones de sensibilidad de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de España y Ecuador.(parte 1)
- Figura 56. Dendograma UPGMA, mirutipo basado en 15 loci MIRU-VNTR y patrones de sensibilidad de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de España y Ecuador.(parte 2)
- Figura 57. Cálculo de la diversidad alélica para los 15 loci miru-vntr en aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* españoles y ecuatorianos
- Figura 58. Árbol de mínima expansión construido a partir de aislados clínicos españoles y ecuatorianos (la diferencia máxima entre complejos clonales es de 2 loci)
- Figura 59. Distribución de los aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* ecuatorianos y españoles en veinte complejos clonales
- Figura 60. Distribución de los aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* ecuatorianos y españoles en distintos linajes y sublinajes

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.	Listado de los loci MIRU-VNTR utilizados en el estudio
Tabla 2.	Volúmenes (μ l) para preparar la master mix de las PCR individuales.
Tabla 3.	Programa de amplificación MIRU-VNTR
Tabla 4.	Interpretación de resultados, asignación de alelos para MIRU 40
Tabla 5.	Ensayo BD MGIT TBc realizado en aislados clínicos procedentes de Ecuador
Tabla 6.	Matriz de similitud de los patrones de restricción obtenidos con el primer XP-G
Tabla 7.	Mirutipo 15 loci de las cepas control H37Rv y H37Ra
Tabla 8.	Comparación de HGDI entre AFLP y MIRU-VNTR

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos epidemiológicos de la Tuberculosis.

Hace más de un siglo, Robert Koch identificó un bacilo ácido alcohol resistente del género *Mycobacterium*, *M. tuberculosis*, como agente causal de la tuberculosis (TB), enfermedad que en 1882 proliferaba y causaba 1/7 de todas las muertes en Europa y 1/3 de las muertes en los adultos jóvenes en edad productiva. (Prescott's, 2011).

El género *Mycobacterium* agrupa más de 120 especies, la mayoría de ellas ambientales y no patógenas, y a las que se conoce como micobacterias no tuberculosas (MNT). *M. tuberculosis* está integrado en el complejo *M. tuberculosis* (MTBC), con otras cinco especies: *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti* y *M. canetti* (Lawn SD, Zumla AI. 2011). *M. tuberculosis* es la más frecuente. *M. bovis* BCG es una variedad de *M. bovis* que en 1921 dio lugar a la vacuna BCG (bacilo de Calmette y Guerin).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en su informe anual 2014 menciona que la TB sigue siendo una de las enfermedades transmisibles con mayor mortalidad; que en 2013 contrajeron la enfermedad 9 millones de personas y 1,5 millones de ellas fallecieron por esta causa (360.000 pacientes VIH-positivos). La incidencia de TB va decayendo lentamente de año en año y se calcula que entre 2000 y 2013 se salvaron 37 millones de vidas gracias a un diagnóstico y tratamiento eficaces. A nivel mundial, la tasa de mortalidad por TB ha tenido una disminución estimada del 45% entre 1990 y 2013, y la tasa de prevalencia de la enfermedad disminuyó en un 41% en el mismo periodo. Dos de las seis regiones de la OMS (Américas y Pacífico Occidental) han alcanzado las tres metas de reducción de la carga de TB (incidencia, prevalencia y mortalidad) para 2015. Las tasas de incidencia, prevalencia y mortalidad están disminuyendo en las regiones de África, Mediterráneo Oriental y Europa. (WHO, 2014).

A nivel mundial, la proporción de nuevos casos de TB multidrogorresistente (TB-MDR) fue del 3,5% en 2013. Del total de personas que contrajeron TB en 2013, más de la mitad (56%) pertenecían a las regiones de Asia Sudoriental y del Pacífico Occidental y una cuarta parte a población de África, que también fue la que presentó mayores tasas de incidencia y mortalidad en relación con el tamaño de la población. India y China representaron el 24% y el 11% de los casos, respectivamente (WHO, 2014).

La OMS informa que aproximadamente un 60% de los casos de TB y de las muertes ocurren en hombres. La cifra estimada de mujeres fallecidas por TB fue de 480.000 en 2014, y 140.000 muertes por TB en niños.

En los países desarrollados, entre ellos España, debido al fenómeno de la inmigración masiva desde países con altas tasas endémicas de TB, la incidencia de la enfermedad no ha caído tanto como se esperaba; para el año 2014 la OMS informó una incidencia (incluye VIH + TB) de 12 casos por 100.000 habitantes y una prevalencia (incluye VIH + TB) de 15 casos por 100.000 habitantes; para el caso de países en desarrollo como es Ecuador, la OMS informó una incidencia (incluye HIV + TB) de 54 casos por 100.000 habitantes y una prevalencia (incluye VIH + TB) de 78 casos por 100.000 habitantes (WHO 2015) (Figura 1.).

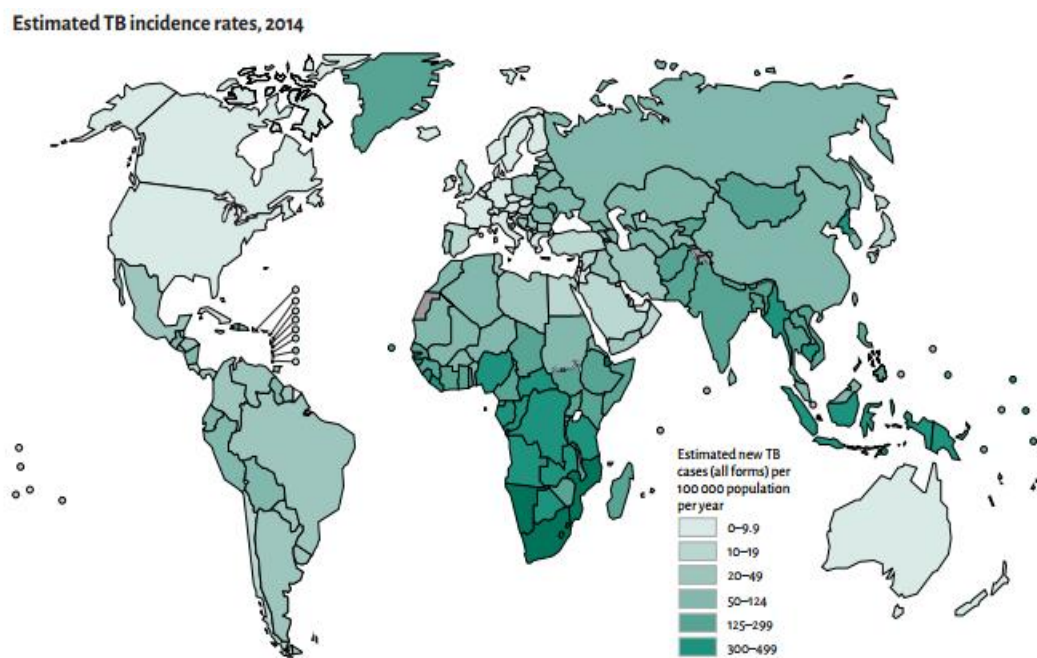


Figura 1. Incidencia mundial estimada de Tuberculosis 2014. Tomado de http://www.who.int/tb/publications/global_report/es/

El control de la TB se fundamenta en programas que se basan en el diagnóstico precoz, la correcta cumplimentación del tratamiento, la localización de contactos, y la vigilancia. Desafortunadamente, en muchos países no es posible aplicar estos programas de manera efectiva. Adicionalmente, la vacuna BCG ha mostrado un bajo rendimiento en

el control de la TB. Desde 2003, el Fondo Mundial de Lucha contra el SIDA, la TB y la Malaria ha hecho grandes esfuerzos para promover la expansión de los programas de control en países con escasos recursos económicos. En el año 2007 la OMS, la Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias, el Ministerio de Salud Pública (MSP) del Ecuador y diversas organizaciones no gubernamentales (ONGs) como Desarrollo y Autogestión (DyA), Red Internacional en Organizaciones en Salud (RIOS), Centro de Epidemiología Comunitaria y Medicina Tropical (CECOMET) y Fundación Alli Causai ampliaron a otras poblaciones el programa de DOTS (Tratamiento directamente observado) Comunitario que se había implementado en el año 2001. Actualmente el MSP junto con el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) realizan las acciones necesarias para el control de la TB en el Ecuador con énfasis en las poblaciones vulnerables.

La identificación de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente (resistente para al menos isoniacida y rifampicina) es uno de los aspectos más importantes sobre los que incide el control mundial de la TB, puesto que requiere intervención epidemiológica y terapéutica tempranas. En 2014, la OMS estimó que 480.000 personas contrajeron TB-MDR y además se calcula que un 9,7% de los pacientes con TB-MDR tenían TB extremadamente-resistente (TB-XDR); TB-MDR más resistencia a fluoroquinolonas y alguna de las drogas inyectables de la segunda línea (amikacina, capreomicina y kanamicina).

Para España y Ecuador en 2014 se declararon 8 y 200 casos nuevos de TB-MDR respectivamente, entre los casos notificados de TB pulmonar. (WHO 2015). (Figura 2.)

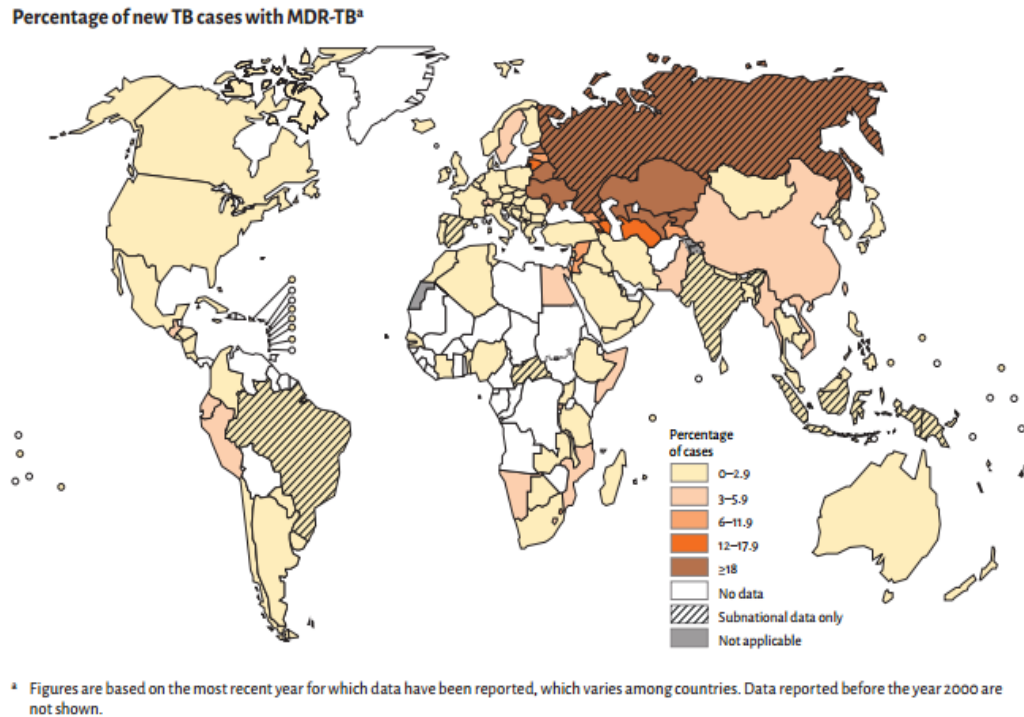


Figura 2. Casos nuevos de Tuberculosis MDR 2014.

http://www.who.int/tb/publications/global_report/es/

1.2 Aspectos biológicos y estructurales de las Micobacterias: *Mycobacterium tuberculosis*

Los organismos del género *Mycobacterium* son bacilos aerobios inmóviles y no esporulados con un tamaño de 0,2 a 0,6 μm x 1 a 10 μm . En algunos casos, estos bacilos forman filamentos ramificados, que pueden romperse con facilidad. Se caracterizan por un elevado contenido (61% - 71%) de guanosina + citosina (G + C) en su ácido desoxirribonucleico (ADN). La pared celular es rica en lípidos, lo que hace que su superficie sea hidrofóbica y por ello confiere resistencia frente a muchos desinfectantes y frente a las tinciones habituales de laboratorio. Adicionalmente, esta riqueza lipídica (presencia de ácidos micólicos con 70 a 90 átomos de carbono), es responsable de su característica ácido-alcohol resistencia. Debido a que la pared celular de las micobacterias es compleja y a que este grupo de microorganismos es exigente desde el

punto de vista nutricional, la mayoría crece lentamente y se dividen cada 12 a 24 horas (Murray *et al.* 2009).

La estructura básica de la pared celular (Figura 3.) es característica de las bacterias grampositivas: una membrana citoplasmática interna cubierta con una gruesa capa de peptidoglicano y carente de membrana externa. No obstante, la estructura de la pared celular micobacteriana es más compleja que la de cualquier otra bacteria grampositiva ya que en la membrana plasmática se anclan proteínas, manósido de fosfatidilinositol y lipoarabinomanano (LAM). El LAM presenta una relación funcional con los lipopolisacáridos O antigénicos presentes en otras bacterias. La capa de peptidoglicano forma el esqueleto básico al que se unen los arabinogalactanos, unos polisacáridos ramificados formados por D-arabinosa y D-galactosa. El residuo terminal de D-arabinosa se esterifica para dar lugar a ácidos micólicos hidrofóbicos de alto peso molecular a los que se anclan moléculas de glucolípidos de superficie. También se detectan otros lípidos, glucolípidos y peptidoglucolípidos. Los componentes lipídicos representan el 60% del peso de la pared celular. A lo largo de las capas de la pared celular se intercalan proteínas transportadoras y porinas, las cuales constituyen antígenos importantes a nivel biológico ya que estimulan la respuesta inmunitaria celular del paciente frente a la infección. Se usan preparaciones parcialmente purificadas de estos derivados proteicos purificados (PPD) como pruebas de reactividad cutánea para determinar la exposición a *M. tuberculosis*. Se han empleado preparaciones similares de otras micobacterias como reactivos específicos cutáneos. (Murray *et al.* 2009).

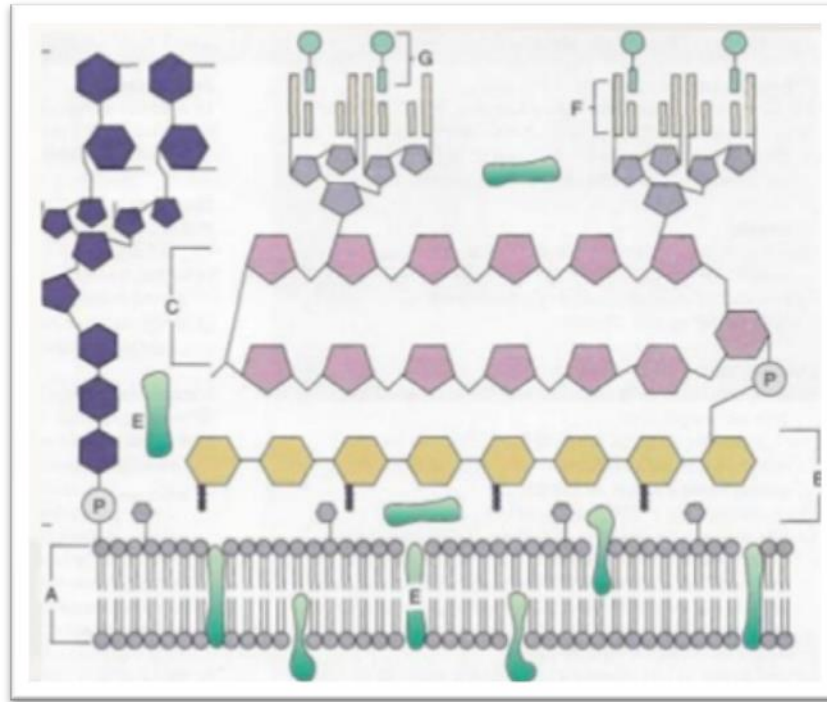


Figura 3. Estructura de la pared celular micobacteriana. Consta de (A) membrana plásmica, (B) peptidoglucano, (C) arabinogalactano, (D) lipoarabinomano con cabeza de manosa, (E) proteínas asociadas a la membrana plasmática y a la pared celular, (F) ácidos micólicos y (G) moléculas de glucolípidos de superficie asociados a los ácidos micólicos. Tomado de Microbiología Médica, Murray *et.al.* 7ma ed. 2013.

El complejo *M. tuberculosis* (MTBC) comprende especies estrechamente relacionadas como *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. caprae*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* y *M. pinnipedii* que causan tuberculosis en humanos y animales. A pesar de la estrecha relación genética como se demostró por hibridación DNA-DNA o por secuenciación del gen 16S rRNA, los miembros del complejo MTBC difieren en el huésped y su patogenicidad. El huésped natural de *M. tuberculosis* y *M. africanum* es el humano, mientras que *M. bovis* puede causar enfermedad en un amplio rango de animales domésticos y salvajes. De acuerdo a las características bioquímicas, se han descrito dos subgrupos de *M. africanum* según su origen geográfico, si corresponden al oeste de África (subtipo I) o al este de África (subtipo II). Según el análisis bioquímico, *M. africanum* subtipo I está más estrechamente relacionado con *M. bovis*, mientras que el

subtipo II se relaciona más con *M. tuberculosis*. Uno de los rasgos que caracteriza a *M. bovis* subsp. *bovis* es su resistencia a pirazinamida. En el caso de *M. caprae* (sensible a pirazinamida), Aranaz *et al* (2003) describen en su trabajo que el análisis de la secuencia del gen *gyrB*, muestra sustituciones de nucleótidos no encontrados en otros miembros del complejo *M. tuberculosis*, por lo que se propone como una especie diferente. La cepa del bacilo atenuado para la vacuna Calmette-Guerin (BCG) se deriva de una cepa de *M. bovis* y ha sido usada como una vacuna contra la TB e inmunoterapia contra el cáncer. *Mycobacterium microti* infecta a pequeños roedores y últimamente se ha comunicado algunos casos de infección en humanos. *Mycobacterium canetti* ha sido descrito como un nuevo taxón patogénico del MTBC y se han comunicado algunos casos muy raros de pacientes infectados que viven principalmente en África (Richter 2003). *Mycobacterium pinnipedii*: afecta a focas y leones marinos en el hemisferio sur. En fechas recientes se ha aislado en seres humanos (Kiers *et al*, 2008)

1.3 Patogenia, inmunidad y manifestaciones clínicas de *Mycobacterium tuberculosis*.

M. tuberculosis es un patógeno intracelular capaz de producir infecciones de por vida. El contagio se produce habitualmente por vía aerógena a partir de pacientes bacilíferos con lesiones pulmonares “abiertas”, es decir, conectadas con el exterior por un bronquio de drenaje. Al toser se generan aerosoles de pequeñas partículas líquidas (gotas de Flügge), en cuyo interior se encierran uno o dos bacilos. Al evaporarse queda tan solo el núcleo de bacilos que permanece flotando en el medio ambiente y se desplaza con las corrientes de aire pudiendo ser aspirado por otras personas. Las partículas de tamaño superior a 10 μm quedan retenidas en la barrera mucosa de las vías respiratorias superiores y son eliminadas por el sistema defensivo mucociliar, pero las de menor tamaño (entre 1 y 5 μm) tienen la capacidad de llegar hasta los alvéolos y desencadenan la primoinfección. (Lozano J. 2002)

A diferencia de la mayor parte de las bacterias que sufren fagocitosis, *M. tuberculosis* impide la fusión del fagosoma con los lisosomas al inhibir la molécula de unión específica, el antígeno endosomal específico 1 [EEA1]. El fagosoma es capaz de fusionarse a otras vesículas intracelulares para facilitar el acceso del patógeno a nutrientes y su proceso de replicación intravacuolar. Las bacterias fagocitadas también

pueden eludir la destrucción mediada por los macrófagos con la formación de intermediarios reactivos del nitrógeno creados entre el óxido nítrico y los aniones superóxido al catabolizar catalíticamente los oxidantes generados.

Los macrófagos secretan interleucina 12 (IL-12) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en respuesta a la infección por *M. tuberculosis*. Estas citocinas aumentan la inflamación localizada al reclutar linfocitos T y células *natural killer* (NK) hacia las zonas de los macrófagos infectados, incluida la diferenciación de los linfocitos TH1 (linfocitos T colaboradores) con la consiguiente secreción de interferón gama (IFN- γ). Cuando existe IFN- γ , los macrófagos infectados se activan, lo que aumenta la fusión entre los fagosomas y los lisosomas y la destrucción intracelular. El TNF- α estimula la producción de óxido nítrico y los intermediarios reactivos del nitrógeno relacionados, lo que potencia la destrucción intracelular. Los pacientes con una producción disminuida de IFN- γ o TNF- α o que sufren defectos en los receptores para estas citocinas tienen un mayor riesgo de sufrir infecciones graves por micobacterias.

Si cuando los macrófagos son estimulados hay solo una pequeña carga antigénica, las bacterias se destruyen con daño tisular mínimo. Sin embargo, cuando la concentración bacteriana es elevada, la respuesta inmunitaria celular da lugar a la necrosis tisular. Muchos factores del anfitrión están implicados en este proceso, como la toxicidad de las citocinas, la activación local de la cascada del complemento, la isquemia y la exposición a enzimas hidrolíticas generadas por los macrófagos y a productos intermedios reactivos del oxígeno. No se conoce ninguna toxina o enzima micobacteriana que se asocie a la destrucción tisular.

La eficacia de la eliminación bacteriana depende en parte del tamaño del foco de infección. Los macrófagos alveolares, las células epiteloideas y las células gigantes de Langhans con las micobacterias intracelulares forman el núcleo central de una masa necrótica que se rodea de una pared densa de células T CD4, CD8, NK y macrófagos. Esta estructura, que se llama granuloma, impide la diseminación posterior de las bacterias. Si el granuloma es pequeño, se produce una destrucción eficaz de las bacterias intracelulares; sin embargo, los granulomas más grandes o caseosos se encapsulan con fibrina y protegen eficazmente a las bacterias de la eliminación producida por los macrófagos (Murray et al. 2009).

Una persona presenta infección tuberculosa latente cuando la infección tuberculosa no progresa a enfermedad; no presenta signos o síntomas de enfermedad, pero tiene en su organismo bacilos tuberculosos vivos. Existen individuos en los que la inmunidad específica es insuficiente para evitar el desarrollo de la enfermedad y entre un 10% a 15% de ellos la desarrollan a lo largo de su vida. En los dos primeros años aparecen entre el 50% a 80% de los casos de enfermedad tuberculosa. La enfermedad que se desarrolla dentro de los primeros cinco años tras la infección primaria se denomina tuberculosis primaria. Cuando la enfermedad se produce mucho tiempo después de la primo-infección se denomina tuberculosis posprimaria, secundaria o de tipo adulto. El declive del sistema inmunitario permite el desarrollo de los bacilos procedentes de la primoinfección (tuberculosis por reactivación endógena). También puede ocurrir que la persona reciba nuevas exposiciones abundantes, repetidas o de cepas de especial virulencia del bacilo (tuberculosis por reinfección exógena) (Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre el Diagnóstico, el Tratamiento y la Prevención de la Tuberculosis, 2010).

Aunque la TB puede afectar a cualquier órgano, la mayoría de las infecciones en pacientes inmunocompetentes están restringidas a los pulmones. El foco pulmonar inicial se encuentra en los campos pulmonares medios o inferiores, donde los bacilos tuberculosos se pueden multiplicar libremente. Se activa la inmunidad celular del anfitrión, y cesa la replicación de las micobacterias en la mayoría de los pacientes entre 3 y 6 semanas después de la exposición al microorganismo. Alrededor del 5% de los pacientes expuestos a *M. tuberculosis* evolucionan hasta desarrollar una enfermedad activa a lo largo de los 2 años siguientes, y entre un 5% y 10% desarrolla la enfermedad en una fase posterior.

La probabilidad de que la infección progrese a una enfermedad activa depende tanto de la dosis infecciosa como del estado inmunológico del paciente. Por ejemplo, alrededor del 10% de los pacientes infectados por VIH con bajo recuento de linfocitos T CD4 desarrolla enfermedad activa durante el año siguiente a la exposición en comparación con el 10% de riesgo de enfermedad durante toda la vida en los pacientes VIH negativos. En los sujetos con una infección por VIH, la enfermedad suele aparecer antes del inicio de otras infecciones oportunistas, se disemina con frecuencia dos veces mayor a localizaciones extrapulmonares y puede conducir rápidamente a la muerte.

Los signos y síntomas clínicos de la TB son el reflejo de la localización de la infección y la enfermedad primaria normalmente se restringe a las vías respiratorias inferiores. La enfermedad tiene un comienzo insidioso. Los pacientes suelen tener síntomas inespecíficos como malestar general, adelgazamiento, tos y sudoración nocturna. El esputo puede ser escaso o hemoptoico y purulento. La producción de esputos hemoptoicos se asocia a la destrucción tisular (enfermedad cavitada). El diagnóstico de la tuberculosis es un diagnóstico clínico y microbiológico que se apoya en: 1) indicios radiológicos de enfermedad pulmonar; 2) resultados positivos en la prueba de reactividad cutánea, y 3) detección en el laboratorio de micobacterias al microscopio, cultivo y/o PCR.

Como se ha comentado previamente, la TB extrapulmonar puede ser resultado de la diseminación hematogena de los bacilos durante la fase inicial de multiplicación. Puede no haber indicios de enfermedad pulmonar en pacientes con TB diseminada (miliar) (Murray 2009).

1.4 Diagnóstico

1.4.1 Diagnóstico Inmunológico

1.4.1.1 Prueba de la tuberculina (PT)

La prueba estándar para el diagnóstico de la *infección* tuberculosa es la prueba de la tuberculina (PT), en la que se utiliza un extracto obtenido del filtrado del cultivo de bacilos tuberculosos, esterilizado y concentrado. La técnica más común para realizar la PT es la intradermorreacción, conocida como técnica de Mantoux. Se practica mediante la inyección intradérmica en la cara ventral del antebrazo de 0,1 ml de PPD (*purified protein derivative*), a la dosis de 2 UT, lo cual produce una reacción dérmica que se lee a las 48-72 horas; se debe medir el diámetro transversal de la induración respecto al eje longitudinal del antebrazo. El PPD contiene proteínas que son comunes a *Mycobacterium tuberculosis*, al bacilo de la vacuna BCG y a algunas micobacterias ambientales, lo que resta especificidad a la PT.

Para considerar una PT como positiva e indicativa de infección tuberculosa se debe tener en cuenta la probabilidad de que el individuo se haya infectado por el bacilo tuberculoso y el riesgo que tenga para desarrollar la enfermedad. En España la prueba se considera positiva cuando la induración es ≥ 5 mm en las personas que no han sido vacunadas con BCG. En las personas vacunadas con BCG la interpretación de la PT se complica por la interferencia de la vacunación y la dificultad de discernir entre el efecto de la vacuna y la infección tuberculosa. En la práctica clínica, se acepta que en los colectivos con elevado riesgo de enfermar tras infección, no se tenga en cuenta el antecedente de vacunación. Con este criterio, en las personas vacunadas una PT ≥ 5 mm se considera positiva cuando se trata de contactos íntimos o frecuentes de pacientes tuberculosos bacilíferos, así como en las personas con lesiones residuales compatibles con TB en la radiografía de tórax, con bacteriología negativa y control evolutivo que descarta enfermedad. En personas con inmunodepresión importante (infectados por el VIH, trasplantados, tratamientos biológicos y con corticoides), se acepta como positiva cualquier induración de la PT. (González-Martín et. Al, 2010).

1.4.1.2 Interferon gamma release assay (IGRA)

Estas técnicas se basan en la detección del interferón gamma en sangre (interferón gamma release assay [IGRA]), una citoquina fundamental en el control de la infección tuberculosa, que se libera como respuesta a la estimulación *in vitro* de las células T sensibilizadas con antígenos específicos de *M. tuberculosis*. En la actualidad se emplean para la estimulación de las células T, los antígenos de la región genética RD1: early secretory antigen target 6 (ESAT-6) y cultura filtrate protein 10 (CFP-10), y el antígeno de la región genética RD11: RV2654, presentes en el complejo *M. tuberculosis* pero ausentes tanto en la cepa vacunal *M. bovis* BCG como en la mayoría de las micobacterias atípicas (excepto en *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum* y *Mycobacterium szulgai*).

Las técnicas IGRA permiten discriminar a los individuos infectados por *M. tuberculosis* de los vacunados por BCG y de los infectados por otras micobacterias, excluyendo las mencionadas.

Las IGRA presentan ventajas respecto a la PT, ya que son objetivas, la determinación puede repetirse en caso necesario, se elimina la visita de la lectura, se evita la pérdida de individuos que no acuden a dicha visita, son fáciles de estandarizar y aplicar en el laboratorio, permiten la inclusión de controles positivos para detectar a los pacientes anérgicos y, al realizarse en el laboratorio, se respeta la intimidad del individuo. El principal inconveniente de las IGRA es su mayor coste económico respecto a la PT. (Santín Cerezales y Domínguez, 2011)

En la actualidad se disponen de 2 pruebas comercializadas: QuantiFERON-TB Gold In-Tube, que utiliza una técnica de ELISA, y T-SPOT-TB, basado en la técnica ELISPOT. Ambas pruebas presentan ventajas operacionales respecto a la tuberculina y son significativamente más específicas en la población vacunada. Se ha constatado que permiten identificar un exceso de PT positivas atribuibles a infecciones por especies de micobacterias distintas a *M. tuberculosis*. Los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) recomiendan el uso indistinto de la tuberculina o de QuantiFERON-TB Gold para el diagnóstico de la infección tuberculosa, mientras que las demás sociedades científicas en general aconsejan el empleo de la nueva tecnología en combinación con la tuberculina. Si la PT resulta positiva y el individuo está vacunado con BCG, se emplearía la técnica de detección de interferón gamma para descartar el efecto vacuna. Si la PT resulta negativa pero el individuo está inmunodeprimido, para excluir un falso negativo se llevaría a cabo la determinación de interferón gamma, dada su mayor sensibilidad respecto a la PT. (González-Martín et. Al, 2010)

1.4.2 Diagnóstico Microbiológico

El diagnóstico microbiológico de la TB es un diagnóstico directo, basado en la visualización de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) en la muestra clínica y en el aislamiento a partir del cultivo de la micobacteria causante de la infección y en la detección de genoma micobacteriano. Por ello, es fundamental que las muestras remitidas al laboratorio cumplan una serie de requisitos de los que dependerá la calidad y la eficiencia de los resultados microbiológicos. En principio, todo tipo de muestra puede enviarse para estudio micobacteriológico, la elección de la misma estará determinada por la sintomatología que presente el paciente y su enfermedad de base, primando siempre

las más sencillas de obtener y los métodos menos invasivos, siendo la mayoría de las muestras que llegan al laboratorio, muestras de origen respiratorio.

El diagnóstico mediante microscopía se basa en la composición lipídica de la pared micobacteriana que le permite retener los colorantes de tinción, resistiendo la acción de decolorantes como la combinación de un ácido (sulfúrico o nítrico) con alcohol. La ácido-alcohol resistencia diferencia específicamente a las micobacterias (bácilos ácido-alcohol resistentes [BAAR]) del resto de bacterias. La tinción más utilizada es la descrita por Zhiel y Neelsen, que tiñe las micobacterias de rojo sobre fondo azul, en contra posición a las demás bacterias, que se tiñen de azul. Existen tinciones basadas en colorantes fluorescentes, donde las micobacterias son luminosas sobre fondo oscuro. La más conocida es la tinción de auramina-rodamina. La sensibilidad de las tinciones fluorescentes es un 10% superior. Requieren mayor experiencia del observador y disponer de microscopio de fluorescencia. Recientemente se han diseñado microscopios basados en tecnología *light-emitting diode* (LED), más económicos y con menor mantenimiento, que permiten su instauración en países de baja renta (González-Martin 2014).

La microscopía o baciloscopía es la prueba más rápida, posible en menos de 2 h, y la más económica. Su principal limitación es la sensibilidad, ya que se requiere que la muestra contenga 5.000 – 10.000 bacterias/ml para ser positiva (Parsons *et.al.* 2011). La especificidad de la tinción es muy elevada si el observador tiene experiencia, ya que aunque algunas especies pueden ser parcialmente ácido-alcohol resistentes, como *Nocardia* o *Rhodococcus*, su incidencia es baja y no plantean dificultades de diagnóstico diferencial. El resultado de la tinción se puede expresar en una escala de 0 a 4 cruces, una aproximación semicuantitativa a la carga bacteriana. En la TB pulmonar la intensidad de la baciloscopía tiene un triple uso: diagnóstico y extensión de la TB, monitorización de la respuesta al tratamiento e indicador de contagiosidad del paciente (González-Martin 2014).

Si bien el método más rápido, sencillo y económico disponible es la baciloscopía, su variable sensibilidad (del 22 al 80%) ha limitado su utilidad, especialmente en las zonas geográficas de menor incidencia de la enfermedad y en las formas extrapulmonares (paubacilares) de ésta. Por otro lado, a pesar de tener una buena especificidad global, en

aquellas áreas de mayor incidencia de aislamientos clínicos de micobacterias no tuberculosas (MNT), la baciloscopía tiene un valor predictivo positivo bajo (entre el 50 y el 80%). Hoy en día el cultivo continúa siendo el método de referencia por su sensibilidad y por permitir la realización de estudios posteriores en base al aislado micobacteriano (identificación, sensibilidad y tipificación epidemiológica). El dintel de positividad está en 100-1.000 bacterias/ml, de 50-100 veces más sensible que la microscopia. Debido al crecimiento lento de las micobacterias, la muestra debe someterse a un proceso previo de descontaminación, que se consigue sometiendo la muestra a pH intensamente alcalino con NaOH durante 20 min, en los que la mayoría de bacterias presentes se lisarán. Transcurrido este tiempo, se revierte a pH neutro y se concentra. Las micobacterias sobreviven a la descontaminación gracias a la estructura de su pared bacteriana. Sin embargo, la descontaminación tampoco es inocua para ellas. Debe seguirse un especial cuidado en neutralizar el pH y en centrifugar la muestra en condiciones de refrigeración. Aun así, se calcula que hasta el 30% de las micobacterias en la muestra morirán, por lo que es conveniente evitar la descontaminación en muestras estériles. Este proceso confiere al cultivo una complejidad específica y exige condiciones de seguridad superiores a las necesarias para la mayoría de los microorganismos. (González-Martin 2014).

Los medios para cultivar micobacterias son específicos y los más conocidos son los sólidos que incorporan huevo entre sus componentes, como el de Lowenstein-Jensen, diseñado durante el primer tercio del siglo XX. Con menor difusión también se utilizan otros sólidos, como Coletsos, Trudeau, Ogawa, etc. Entre los medios sólidos con agar y sin huevo los más usados son Middlebrook 7H10 y 7H11. Durante décadas no se han usado medios de cultivo líquidos, más sensibles que los sólidos, debido a la dificultad en interpretarlos macroscópicamente. En los últimos 25 años se han desarrollado diferentes sistemas que permiten detectar el crecimiento de los cultivos líquidos. El primero fue el método radiométrico BACTEC 460TB (Becton Dickinson, MD, EE.UU.), basado en la utilización de medio líquido 12B que contiene ácido palmítico marcado con C¹⁴. En presencia de crecimiento se metaboliza este sustrato y las micobacterias liberan C¹⁴ como producto de excreción. El sistema dispone de un lector que detecta C¹⁴ cuando el crecimiento es precoz. Posteriormente se han desarrollado métodos más automáticos, basados en fluorescencia, que evitan los inconvenientes de la radiactividad. Estos incorporan en cada tubo de cultivo un marcador de fluorescencia sensible a cambios en la presión de oxígeno o en la concentración de CO₂ en el recipiente de cultivo y que

expresan crecimiento bacteriano. Los recipientes con las muestras se introducen en incubadoras a 35-37°C que monitorizan cada hora los sensores de cada cultivo a través de un láser, de forma que el equipo incubador indica la presencia de cultivos positivos, así como de los negativos que han cumplido el protocolo de incubación. Actualmente se dispone de 3 sistemas fluorimétricos validados: BACTEC MGIT960 (Becton Dickinson, MD, EE.UU.), MB BacT (BioMerieux, Francia) y VersaTREK (Termo Fisher, MA, EE.UU.). (González-Martin 2014).

El rendimiento de los cultivos líquidos es superior a los sólidos, por lo que deben hacerse siempre. El cultivo es positivo en alrededor del 85-90% de las TB pulmonares. En localizaciones extrapulmonares el rendimiento es más bajo, raramente superior al 50%, exceptuando la localización linfática o en órganos sólidos, similares a la pulmonar (Parsons *et.al.* 2011).

Una limitación importante del cultivo es la lentitud del resultado, que puede requerir varias semanas. Las muestras en las que la tinción ha sido positiva suelen crecer en 3 – 12 días, mientras que en las tinciones negativas puede tardar 15 – 30 días. Los cultivos líquidos suelen positivizarse antes, en la franja inferior de estos intervalos. La sensibilidad de los cultivos líquidos es ligeramente superior a la de los sólidos, sobre todo en las muestras extrapulmonares y en el aislamiento de micobacterias no tuberculosas. El protocolo de cultivo internacionalmente aceptado mantiene la incubación de los cultivos hasta 42 días (Alcaide F. *et.al.*, 2000 y Woods GL. *et. al.*1997).

En los últimos 15 años se han desarrollado técnicas moleculares o genotípicas de aplicación en el campo del diagnóstico rápido de la enfermedad tuberculosa, siendo uno de los aspectos más relevantes la detección directa de *M. tuberculosis* en muestra clínica. El diagnóstico rápido (de 24 a 48 horas) de la TB activa es uno de los mayores retos en el control de la enfermedad, ya que permite realizar intervención epidemiológica (aislamiento y estudio de contactos) y tratamiento precoz, lo cual favorece la interrupción de la transmisión infecciosa. Todas estas técnicas (comerciales o caseras) se fundamentan en la amplificación de secuencias genéticas (ADN o ARN) específicas del complejo *M. tuberculosis* y su posterior detección, lo que no implica necesariamente la viabilidad de la micobacteria. Sin embargo, dada la variabilidad de los diseños y métodos empleados y la falta de estandarización entre los estudios, no existe un análisis comparativo concluyente

para la evaluación de éstos. Adicionalmente, el método de referencia microbiológico continúa siendo el cultivo, el cual tiene una sensibilidad teórica inferior a los métodos de amplificación de ácidos nucleicos (AAN), lo que representa un inconveniente añadido. No obstante, hoy se sabe que estos métodos moleculares tienen un valor predictivo positivo (VPP) mayor que la microscopía (>95%) en las muestras con baciloscopia positiva en áreas geográficas con un importante número de aislamientos de MNT. Por otro lado, en las muestras con baciloscopia negativa y cultivo positivo, los métodos de AAN son capaces de confirmar de forma rápida la presencia de *M. tuberculosis* en el 50 al 80% de los casos. Además globalmente, los métodos moleculares son capaces de detectar la presencia de *M. tuberculosis* en el 80 al 90% de los pacientes con sospecha clínica de TB pulmonar, varias semanas antes que el cultivo (Dinnes J. *et.al.*,2007 y CDC, 2009).

Otra de las posibilidades diagnósticas que han desarrollado alguno de estos métodos comerciales, importante en lo que se refiere al diagnóstico rápido de la TB-MDR (isoniacida y rifampicina), es la detección de mutaciones en las dianas cromosómicas más frecuentemente relacionadas con la resistencia fenotípica a los fármacos.

Así, aunque las técnicas de biología molecular no pueden hoy en día sustituir completamente a la metodología tradicional en el diagnóstico de la TB, son un pilar fundamental en el diagnóstico rápido de ésta y de los casos graves de multirresistencia (Alcaide, *et. al.* 2009).

En octubre de 2013, la OMS recomendó el uso de la prueba Xpert MTB / RIF para el diagnóstico de la TB en los niños y algunas formas de TB extrapulmonar; además de considerarla como prueba diagnóstica en todos los individuos sospechosos de tener TB pulmonar, TB resistente a los medicamentos o en pacientes infectados con VIH. Entre 2009 y finales de junio del 2014, cerca de 90.000 personas con MDR-TB fueron detectados a través del proyecto EXPAND-TB, que ha establecido la capacidad para detectar la tuberculosis resistente a los medicamentos mediante la prueba Xpert MTB/RIF en 27 países de bajos y medianos ingresos.

1.4.3 Identificación molecular

En los últimos años y de modo paralelo a las técnicas moleculares de detección genómica sobre muestra directa se han desarrollado varias técnicas moleculares comerciales que permiten la identificación de micobacterias a partir de cultivos tanto en medio sólido como líquido.

La primera gran innovación en la identificación molecular de micobacterias a partir de cultivo (sólido, líquido, incluso hemático) llegó a comienzos de la década de 1990 con las sondas de ADN quimioluminiscentes que permiten identificar, por hibridación con el ARN ribosómico micobacteriano y sin amplificación previa, el complejo *M. tuberculosis* y otras especies de forma rápida y específica. La desventaja es que permiten la identificación de un número restringido de micobacterias entre todas las especies patógenas, requieren de una orientación presuntiva para la elección de la sonda adecuada, no detectan cultivos mixtos y tienen algunos problemas de especificidad. A pesar de ello, estas sondas han sido y continúan siendo, uno de los modelos de referencia en la identificación micobacteriana en combinación con los nuevos sistemas de cultivo automatizados, lo que se hace especialmente evidente para el complejo *M. tuberculosis*, donde obtienen una sensibilidad y especificidad superiores al 99%.

Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado métodos basados en la amplificación de secuencias de ADN específicas y análisis posterior mediante la observación del fragmento amplificado, realizando hibridación, restricción o secuenciación de éste. Así, en la identificación rutinaria a partir de aislamientos obtenidos por cultivo, en la última década se ha dado gran impulso a técnicas comerciales de PCR, que permiten la identificación simultánea de varias especies micobacterianas mediante un método de hibridación inversa en fase sólida tras la amplificación, como son: INNO-LIPA® Mycobacteria v2 y GenoType® *Mycobacterium* CM, AS, MTBC. En el ensayo INNO-LiPA®, la diana de amplificación es la región espaciadora 16S-23S rRNA y permite la identificación de 16 especies del género *Mycobacterium*. En el caso de GenoType® MTBC que está basado en la tecnología DNA-STRIP^R y cuya diana de amplificación es la región 23S rRNA, permite en base a los polimorfismos genéticos de la girasa B, la diferenciación genética de especies/cepas pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* tales

como: *M. africanum*, *M. bovis* BCG, *M. bovis* ssp. *bovis*, *M. bovis* ssp. *caprae*, *M. microti*, y *M. tuberculosis* / *M. canettii*.

Se han publicado varios trabajos en los que se demuestra que ambos sistemas son muy similares, de fácil lectura e interpretación, con una sensibilidad y una especificidad buenas, a partir de cultivos líquidos y sólidos, y ambas técnicas permiten la detección de posibles coinfecciones por diversas especies en una misma muestra. Aunque ambos métodos permiten la identificación de un amplio abanico de especies, GenoType dispone de diferentes *kits* comerciales que permiten la identificación de mayor número de especies micobacterianas e incluso la diferenciación de las distintas especies incluidas en el complejo *M. tuberculosis*. En un estudio realizado por Padilla *et al.* (2004), en el que se evaluaron ambos métodos, el porcentaje global de concordancia fue del 91,0%. Para muestras con resultados interpretables, el test INNO-LiPA® identificó correctamente 109 of 110 (99,1%), mientras que GenoType® identificó correctamente 100 of 102 (98,0%). Además, también mediante estos métodos (GenoType MTBDR plus) se puede detectar la presencia de mutaciones en los genes que determinan resistencia a isoniacida y rifampicina. Por otra parte, estos equipos comerciales se han ido adaptando y validando en los últimos años para la detección genómica de micobacterias en muestra directa (Dominguez J *et al.*, 2008).

Como alternativa a estas técnicas moleculares, y buscando siempre la rapidez en el diagnóstico, las técnicas inmunocromatográficas han adquirido un papel relevante en el diagnóstico de rutina de aislados clínicos de MTBC. Existen varias marcas comerciales que disponen de este producto, que está validado para su aplicación en cultivos positivos en medio líquido, aunque alguna de ellas también dispone de la validación para su uso a partir de cultivos en medio sólido. Uno de los primeros equipos que comenzaron a emplearse en los laboratorios clínicos es el dispositivo BD MGIT TBc (BD), un inmunoanálisis cromatográfico rápido que permite la detección cualitativa de antígenos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* a partir de tubos BD MGIT positivos para bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR). Esta técnica detecta MPT64, una fracción proteica micobacteriana que segregan las células del complejo *Mycobacterium tuberculosis* durante el cultivo a diferencia del resto de micobacterias que no pertenecen a dicho complejo. Una vez que las muestras se añaden al dispositivo de análisis, los antígenos MPT64 se unen a los anticuerpos específicos de MPT64 conjugados con partículas de visualización en la tira del análisis. El complejo antígeno-conjugado se desliza por la tira

de análisis hasta el área de reacción y es atrapado por un segundo anticuerpo específico de MPT64 aplicado a la membrana. Si el antígeno MPT64 está presente en la muestra, las partículas de oro coloidal marcadas producen una reacción de color que se manifiesta de forma visible en forma de línea de un color entre rosa y rojo. El resultado es positivo cuando se observa la formación de dos líneas en las posiciones “T” (análisis) y “C” (control de la ventana de lectura) respectivamente, será negativo cuando solamente se observe una línea en la posición “C” (control) y la prueba quedará inválida cuando esté ausente la línea correspondiente a “C” (control). (Figura 4).

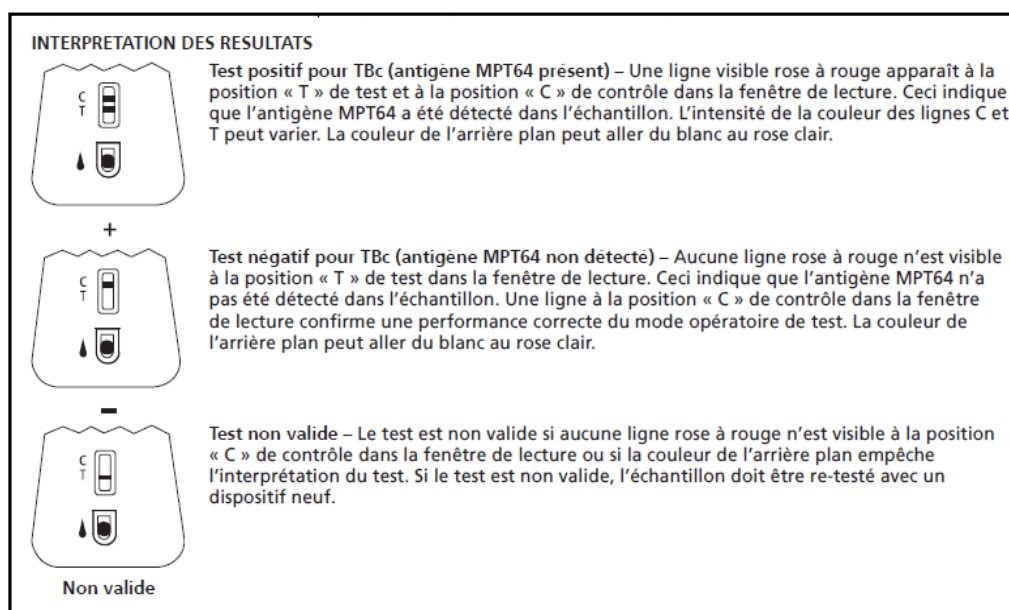


Figura N° 4 Interpretación de los resultados del Test de Identificación BD MGIT TBc

De esta forma podemos identificar si los aislados clínicos pertenecen o no al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, teniendo en consideración que la prueba presenta algunas limitaciones como es no poder detectar algunas cepas secundarias de *M. bovis* BCG que no producen el antígeno MPT64, así como cepas MTBC que presentan una mutación del gen MPT64, en cuyo caso el resultado del análisis sería negativo si se analizan con este dispositivo.

1.5 Tratamiento

El objetivo del control de la TB es reducir su morbi-mortalidad mediante el tratamiento precoz y adecuado de la enfermedad, la prevención de la transmisión a partir de pacientes bacilíferos y la prevención de la progresión a enfermedad de personas con infección latente tuberculosa (ILT). Para ello, se requiere el inicio precoz y la correcta cumplimentación de un tratamiento antituberculoso efectivo, así como la identificación de contactos de pacientes con TB infectante y de otras personas con ILT con riesgo de progresar a enfermedad tuberculosa.

Las drogas antituberculosas (DAT) han sido clasificadas en drogas de primera, segunda y tercera línea según su eficacia, resistencia, toxicidad o tolerancia, con la finalidad de poder usarlas en el tratamiento inicial de la TB y distinguirlas de otras que pueden ser solo usadas en situaciones de intolerancia o resistencia. Además esta clasificación es de interés en el diseño de un régimen de tratamiento adecuado para las formas de tuberculosis TB-MDR y TB-XDR.

Los objetivos principales de la terapia anti-tuberculosa son: eliminar el bacilo de la TB lo más rápidamente posible para evitar la aparición de resistencias y para evitar las recaídas mediante la eliminación de bacilos persistentes de sus depósitos corporales. Para esto se emplea una combinación de DAT por un período prolongado de tiempo. *Mycobacterium tuberculosis* tiene un largo tiempo de generación y la capacidad de entrar en periodos de latencia con actividad metabólica baja lo que dificulta la penetración de los antimicrobianos.

El esquema de tratamiento recomendado universalmente tiene una duración media de 6 meses: durante los 2 primeros meses incluiría tratamiento con R (rifampicina), H (isoniacida), Z (pirazinamida) y E (etambutol), seguidos de 4 meses con R e H. Cuando se identifica el aislamiento y se demuestre que es sensible a todos los fármacos se retira el etambutol. Excepcionalmente, en casos paucibacilares podría utilizarse un tratamiento con tres fármacos (RHZ) en la fase inicial (González-Martín et. Al, 2010).

La OMS en su informe anual de Tuberculosis 2014 menciona que en la última década se han orientado los esfuerzos a desarrollar nuevos métodos diagnósticos,

medicamentos y vacunas. Por el momento existen 10 fármacos antituberculosos nuevos o que antes se utilizaban con otros fines terapéuticos en las fases finales de ensayos clínicos. En los dos últimos años han sido aprobados dos nuevos fármacos por las autoridades reguladoras para el tratamiento de TB-MDR bajo condiciones específicas. El primero, bedaquilina, fue aprobado por la U.S. Food and Drug Administration (FDA) en diciembre de 2012 y la OMS publicó en junio de 2013 una guía provisional sobre su uso en el tratamiento de la TB-MDR. La segunda droga, delamanida, fue aprobada oficialmente para su uso en pacientes con TB-MDR por la Agencia Europea de Medicamentos en abril de 2014. Actualmente hay 15 vacunas candidatas que se están estudiando, la mayoría están diseñadas para la prevención de la TB, ya sea a través de la prevención de la infección o la prevención de la progresión de la enfermedad en las personas infectadas. (WHO 2014).

1.6 Epidemiología molecular

La biología molecular contribuye de manera importante a las investigaciones epidemiológicas de las enfermedades infecciosas como es el caso de la TB; permite conocer la dinámica de transmisión de la enfermedad e identificar eventos de transmisión reciente, brotes epidémicos y otras características propias de los procesos infecciosos como inmunidad y resistencia al tratamiento.

La aplicación de estrategias de genotipado en el estudio de la infección por TB ha permitido discriminar los aislados de *Mycobacterium tuberculosis* a nivel de cepa en distintos contextos: a) en el laboratorio, para optimizar eventos de contaminación cruzada, b) en el paciente, para discriminar recurrencias debidas a reactivaciones o reinfecciones e identificar casos con infecciones mixtas; c) en el contexto “micropoblacional”, para identificar casos infectados por una misma cepa (transmisión reciente), y d) en el contexto “macropoblacional”, para definir la distribución internacional de linajes de *M. tuberculosis*, de cepas de alto riesgo o analizar aspectos evolutivos (García 2011).

En los últimos años, los cambios en los escenarios socio-epidemiológicos generados por la inmigración han puesto de manifiesto nuevos retos. Varios estudios han encontrado que la transmisión reciente desempeña un papel menor en la TB en los inmigrantes, lo que sugiere que se debe principalmente a la reactivación/importación. Sin

embargo, la transmisión reciente en inmigrantes se ha observado, y algunos autores han identificado casos de transmisión entre inmigrantes de diferentes orígenes y entre la población inmigrante y autóctona. Un trabajo del 2009 aplicó cuestionarios para calcular el “índice de integración” y puso de manifiesto los valores más altos para los casos en grupos multinacionales. (Barniol, *et al.* 2009).

De manera general, los métodos moleculares incorporados al análisis epidemiológico de la TB se refieren principalmente a la diferenciación de cepas mediante el estudio del ADN, a través de diversos análisis tales como:

1.6.1 Técnicas moleculares

1.6.1.1 Análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción de la secuencia de inserción IS6110 (RFLP-IS6110)

Este método se basa en el análisis de los fragmentos de restricción que hibridan con una sonda de ADN específica para la secuencia de inserción IS6110, generando un patrón de bandas característico para una cepa de *M. tuberculosis* determinada. (Van Embden *et al.* 1993).

Para visualizar los patrones de RFLP-IS6110, el ADN es extraído y purificado a partir de cultivo bacteriano puro, se digiere con una enzima de restricción que presenta un sitio de corte único dentro de la secuencia de inserción IS6110 como lo es *PvuII*, los fragmentos se separan mediante geles de agarosa y se transfieren a una membrana de hibridación a la cual se añade una sonda complementaria al ADN IS6110. La hibridación de los fragmentos de restricción con la sonda se detecta mediante el revelado por autoradiografía generando un patrón de bandas característico para una cepa determinada (van Soolingen 2001).

Desafortunadamente existen aislados de *M. tuberculosis* que contienen pocas (menos de 5 copias) o ninguna copia de la secuencia de inserción IS6110, lo cual disminuye el poder discriminatorio de la técnica siendo necesario aplicar otros marcadores genéticos.

RFLP-IS6110 debido a su reproducibilidad, poder discriminatorio y relativo bajo coste fue considerado por varios años el método de referencia. Sin embargo, esta técnica es laboriosa y requiere cultivos con buen crecimiento bacteriano, lo que conduce a retrasos en la obtención de genotipos.

1.6.1.2 Técnicas basadas en PCR:

En los últimos años se han desarrollado alternativas de genotipificación basadas en PCR. Las técnicas más representativas fueron comparadas desde hace varios años en un estudio multicéntrico, que llegó a la conclusión de que el método basado en la repetición en tándem de número variable fue el método más sólido. Al mismo tiempo, los enfoques más tradicionales también se han mejorado y técnicas como AFLP incluyendo marcaje con fluorescencia han sido usados para analizar localizaciones IS6110 (Thorne 2007).

1.6.1.2.1 Análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP)

La técnica AFLP se describió en su día como un método con muy buenas expectativas como técnica de tipificación bacteriana (Huys *et al.*, 2000), se trataba de un método prometedor, novedoso y que combinaba la aplicabilidad universal con alto poder de discriminación y reproducibilidad (Janssen *et al.*, 1996). Clásicamente, se basa en la ligación de adaptadores a fragmentos de restricción selectivos y posterior amplificación de los mismos mediante PCR con iniciadores específicos que se unen a dichos adaptadores (Salvelkoul *et al.*, 1999). Para ello se requiere una pequeña cantidad de DNA genómico purificado (10-100 ng) que es digerido con enzimas de restricción y los adaptadores de doble cadena se ligan a los fragmentos de restricción obtenidos. Posteriormente, se realiza una amplificación mediante PCR con iniciadores marcados radiactivamente, y los productos de tal amplificación son separados electroforéticamente en geles de poliacrilamida (Vos *et al.*, 1995). Debido a los problemas derivados del uso de iniciadores marcados radiactivamente, también se han desarrollado iniciadores fluorescentes que permiten la detección de los fragmentos en aparatos de secuenciación automática.

El alto grado de polimorfismo obtenido en los patrones de bandas se debe a mutaciones en los sitios de restricción analizados, mutaciones en las secuencias

adyacentes al sitio de restricción y a las inserciones o deleciones en los productos amplificados (Vos *et al.*, 1995), lo que genera una variación en la longitud de los fragmentos obtenidos y que junto con variaciones en los nucleótidos selectivos del extremo 3' de los iniciadores de PCR, permiten una alta cantidad de fragmentos detectables en sistemas de electroforesis (Vaneechoutte, 1996).

La publicación de la secuencia completa del genoma de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv (Cole *et al.*, 1998) ha permitido diseñar una variante del método AFLP que utiliza menos reactivos y permite discriminación de al menos 11 bandas mediante electroforesis en gel de agarosa para dicha cepa (*M. tuberculosis* H37Rv). Junto al software SitesFinder, el cual predice el número de sitios de restricción presentes en el genoma de *M. tuberculosis* así como el número de bandas que generarían los iniciadores de PCR con determinados nucleótidos de selección, se utiliza la enzima de restricción *Xho*I y un iniciador con una G como nucleótido de selección generando 11 bandas en un gel de agarosa al 2,5% revelado con bromuro de etidio. La técnica de AFLP simplificada se basa en el uso de una sola enzima de restricción, un solo adaptador, iniciadores no marcados y electroforesis en geles de agarosa, características que hacen que éste método de genotipificación presente ventajas al ser de bajo coste, más rápido y requiera pequeñas cantidades de ADN (Viader-Salvadó, 2009).

1.6.1.2.2 Spoligotyping

Este método de tipificación basado en PCR fue estandarizado por Kamerbeek *et al.* en 1997. Consiste en la amplificación del locus DR (direct repeats), el cual contiene múltiples secuencias bien conservadas de un tamaño de 36 pb y que se encuentran separadas por secuencias no repetitivas de 34 a 41 pb llamados espaciadores; solo 43 de 94 espaciadores son usados para genotipificación (Van Soolingen, 2001).

Las cepas varían en el número de DRs y en la presencia o ausencia de espaciadores específicos, este polimorfismo probablemente se debe a la recombinación homóloga entre regiones DRs cercanas y distantes y a “rearreglos” ocasionados por la secuencia de inserción IS6110 la cual está presente en la región DR de muchas cepas de *M. tuberculosis*. Debido a que los DRs son secuencias altamente conservadas en las cepas de *M. tuberculosis*, cada copia de DR en el locus DR es un potencial *target* para la amplificación *in vitro* por PCR. La variación de los espaciadores en las DRs conservadas

ha sido usado por Groenen *et al.* para diferenciar cepas de *M. tuberculosis* usando métodos basados en PCR. Por el contrario Kamerbeek *et al.* usan las DRs como target para la amplificación de ADN *in vitro* y la variación en los espaciadores es usada para obtener diferentes patrones de hibridación del ADN amplificado con múltiples sondas dirigidas a los distintos espaciadores. (Kamerbeek *et al* 1997).

Spoligotyping puede ser usado para clasificar a los aislados del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en taxones o subespecies en función de la ausencia o presencia de espaciadores específicos para cada genotipo (Cousins, 1998) (Van Soolingen, 1995). Este método aplicado a cultivos es un método simple, robusto y altamente reproducible. Además los resultados pueden ser expresados mediante códigos numéricos lo cual facilita su interpretación, permite hacer una comparación entre laboratorios y generar una base de datos a nivel mundial.

Dentro de las desventajas de este método es que presenta un poder discriminatorio menor que RFLP por lo tanto se considera como un método de *prescreening* (Cousins *et al.* 1998) o que se puede emplear junto con otra herramienta de genotipificación.

1.6.1.2.3 Unidades Repetitivas Micobacterianas Intercaladas – Número Variable de Repeticiones en Tándem: MIRU-VNTR

Las secuencias repetitivas en tándem están dispersas en miles de copias en prácticamente todos los genomas de eucariotas (Cox and Mirkin, 1997). Secuencias repetitivas cortas (SSRs) de 1–13 pb son generalmente conocidas como microsatélites y aquellas secuencias repetitivas con 10–100 pb se las conoce como minisatélites (Tautz and Renz, 1984; Tautz and Schlotterer, 1994). Muchos de estos *loci* muestran hipervariabilidad en el número de repeticiones en humanos y animales y son conocidos como repeticiones en tándem de número variable (VNTR) (Nakamura *et al.* 1987; 1988).

En bacterias, las secuencias repetitivas tienen un tamaño de hasta 200 pb aproximadamente, son palindrómicas y se distribuyen a lo largo del genoma bacteriano. Para el caso de las enterobacterias se han identificado varias secuencias denominadas como secuencias consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas (ERICs) o unidades repetitivas intergénicas (IRUs)(Sharples and Lloyd 1990; Hulton *et al.* 1991), secuencias

box C (Bachellier et al. 1996) y secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (REPs)(Stern et al. 1984) o unidades palindrómicas (PUs)(Higgins et al., 1982).

Para el caso específico de las micobacterias se describe un nuevo tipo de secuencias repetitivas intercaladas micobacterianas (MIRUs) que inicialmente fueron identificadas en la región intercistronica de un operón codificante para un nuevo sistema micobacteriano de dos componentes llamado *senX3-regX3* con características distintas de otros elementos repetitivos ya que: i) no son secuencias palindrómicas lo que permite la formación de estructuras secundarias estables, ii) son repeticiones directas en tándem, iii) algunos MIRUs contienen un pequeño *Open Reading Frame* (ORF) cuyos codones de inicio y fin se solapan a los codones de inicio y fin de los genes *upstream* y *downstream*. (Supply et al. 1997).

Estas secuencias MIRU están presentes en el genoma de *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium tuberculosis* y *Micobacterium leprae*, están compuestas de secuencias repetitivas de 40–100 pb por lo que se asemejan a los minisatélites presentes en el genoma de eucariotas. Se han descrito 41 MIRUs distribuidos a lo largo del cromosoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. (Supply et al 2000)(Figura 5), de los cuales se han informado sets de 12, 15 y 24 MIRUs altamente polimórficos (Supply 2000; 2006).

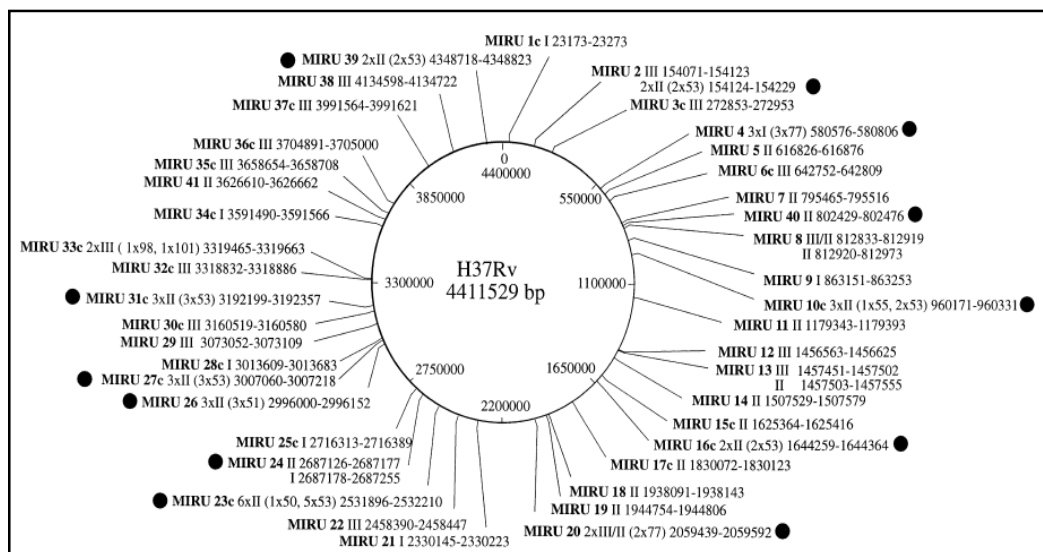


Figura 5. Posición de los 41 loci MIRU en el cromosoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. (Supply *et al.* 2000)

Las variaciones en el número de copias de los MIRUs se deben a inserciones o deleciones que pueden ser bidireccionales. Los loci MIRU representan las estructuras más variables en el genoma de *M. tuberculosis* a diferencia de sus genes estructurales. (Sreevatsan *et al.*, 1997). Además la transferencia horizontal de genes parece estar ausente en *M. tuberculosis* (Cole *et al.* 1998) y solamente las deleciones o inserciones cortas, transposición de pocas secuencias de inserción y variaciones en secuencias de tipo SSR han sido identificadas como fuentes de variaciones genómicas en esta especie (Hermans *et al.* 1992; Poulet and Cole, 1995, Sreevatsan *et al.*, 1997; Behr *et al.*, 1999; Cole, 1999)

Los cambios en los MIRUs se generan esencialmente mediante eventos intralélicos que resultan de alteraciones en el control de recombinación entre secuencias homólogas y la incapacidad de la polimerasa para corregir errores de *slippage*, lo que da como resultado que la bacteria no tenga un sistema de auto reparación eficiente (Mizrahi and Andersen, 1998).

Los genes flanqueantes de los MIRUs están involucrados con diversas vías metabólicas o de regulación de biomoléculas como lípidos, ácidos nucleicos, biosíntesis y degradación de proteínas, producción de energía y señales de transducción. Se presume que podría haber una relación entre la función de éstos genes y el polimorfismo o monomorfismo de sus MIRUs flanqueantes (Supply *et al.* 2000). Se conoce que los cambios en el número de copias de SSR a menudo afecta la expresión de genes involucrados en respuestas adaptativas y en la interacción del microorganismo con su entorno (Weiser *et al.*, 1989; Hood *et al.*, 1996; Peak *et al.*, 1996; van Belkum *et al.*, 1997). Por ello, se presume que los MIRUs tendrían un rol similar en *M. tuberculosis* ya que muchos están insertados en sitios involucrados en el proceso de traducción de genes de operones policistrónicos incluyendo aquellos que codifican para sistemas de regulación de dos componentes (Supply *et al.* 1997).

Debido al polimorfismo que presentan los MIRUs y a la gran estabilidad a través del tiempo, se constituyen como excelentes marcadores para estudios epidemiológicos,

genética de poblaciones y estudios filogenéticos de patógenos pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

La técnica de MIRU-VNTR se basa en amplificaciones mediante PCR usando *primers* específicos para las regiones flanqueantes de los VNTRs, la determinación de tamaño de los amplicones mediante migración electroforética y asignación de número de repeticiones presentes para cada locus amplificado. El resultado es un código numérico de 12, 15 o 24 dígitos (según los loci amplificados) que puede ser analizado mediante herramientas bioinformáticas como www.miru-vnrplus.org, la cual contiene información sobre el número de repeticiones para los 24 loci, patrones spoligotyping, regiones de diferencia (RD), perfiles de polimorfismo de nucleótido simple (SNPs), datos de sensibilidad, patrones RFLP-IS6110 de 186 cepas que representan a los principales linajes MTBC.

1.7 Filogenia global de *Mycobacterium tuberculosis*

La secuenciación completa del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv realizada por Cole *et.al.* en 1998 ha contribuido al mejor entendimiento de la biología y patogenicidad del bacilo para formular nuevas propuestas de métodos diagnósticos, tratamientos terapéuticos y acciones de prevención que eviten la diseminación y mejoren el control de la Tuberculosis a nivel mundial.

El genoma comprende 4.411.529 pares de bases, contiene alrededor de 4.000 genes y tiene un contenido muy alto de guanina + citosina que se refleja en el contenido de aminoácidos de las proteínas. *M. tuberculosis* difiere radicalmente de otras bacterias en que gran parte de su capacidad codificante se dedica a la producción de enzimas implicadas en la lipogénesis y la lipólisis, además contiene dos familias de proteínas ricas en glicina con una estructura repetitiva que puede representar una fuente de variación antigénica. (Cole *et. al* 1998).

M. tuberculosis se ha mantenido entre los ejemplos más extremos de homogeneidad genética bacteriana. La variación genómica de éste patógeno se debe en gran parte a deleciones y mutaciones puntuales.

En 1997, Sreevatsan *et.al.* identificaron tres grupos genéticos de *M. tuberculosis* en base a polimorfismos que se producen por mutaciones en los genes *katG* que codifica la catalasa-peroxidasa confiriendo resistencia a la isoniacida y mutaciones en el gen *gyrA* que codifica la DNA girasa y que puede conferir resistencia a las fluoroquinolonas. En el Grupo 1 se encuentran los organismos evolutivamente más antiguos que provienen de un antecesor común que presenta el codón *katG*⁴⁶³ CTG (Leu) y *gyrA*⁹⁵ ACC (Thr); en el Grupo 2 se ubicaron a los organismos con la mutación *katG*⁴⁶³ CGG (Arg) y en el Grupo 3 aquellos que presentan además la mutación *gyrA*⁹⁵ AGC (Ser) (Sreevatsan *et.al.* 1997).

En el 2002, Brosch *et al.*, analiza la distribución de 20 regiones variables situadas a lo largo del genoma mediante varias técnicas de tipificación y clasificó a las cepas como “ancestrales” y “modernas” en función de la presencia o ausencia de la delección específica para *M. tuberculosis* (TbD1); las cepas agrupadas como “modernas” (East Asian, Beijing, Euro-American) y que no presentan la región TbD1, han sido las responsables de grandes epidemias. La delección de la región de diferencia RD9 y otras delecciones sucesivas permiten caracterizar linajes representados por *M. africanum*, *M. microti* y *M. bovis*. Estos autores concluyeron también que la delección de ciertas regiones variables no ocurre independientemente en diferentes cepas del complejo *M. tuberculosis*, asumiendo que existe poca o casi nula recombinación de segmentos cromosomales entre varios linajes del complejo. (Brosch *et. al.*, 2002)(Figura 6).

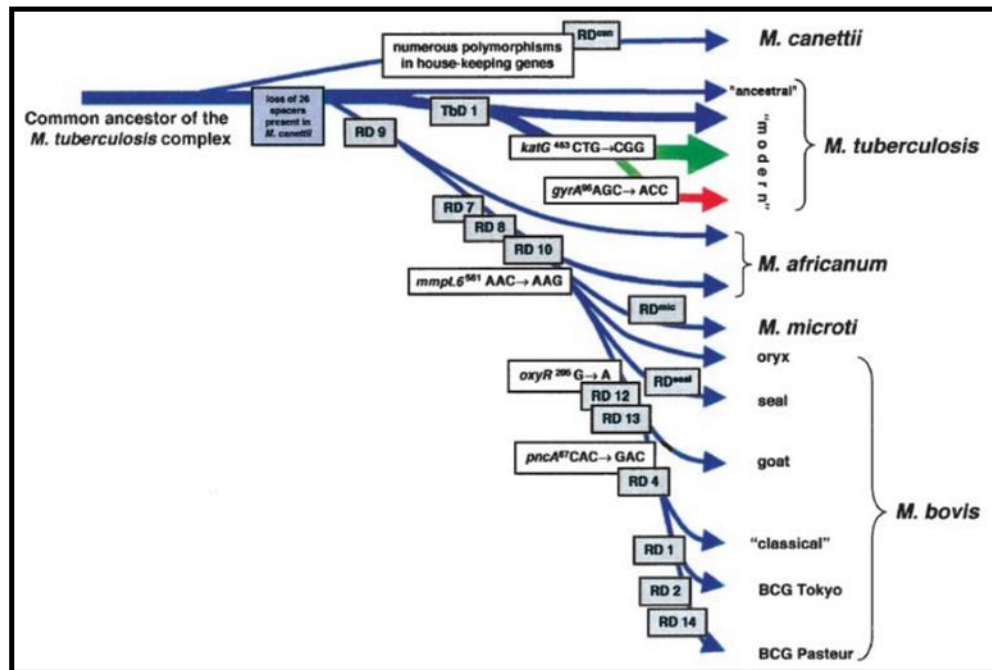


Figura 6: Esquema de la evolución de *M. tuberculosis* complex. Los organismos pertenecientes al Grupo 1 se muestran en azul, las cepas pertenecientes al Grupo 2 en verde y las cepas pertenecientes al Grupo 3 en rojo. Tomado de Brosch *et al.* 2002

En el año 2004, Baker *et al.*, afirmaron que el estudio de la variación génica neutral en los genes asociados con la resistencia a drogas antimicrobianas permite construir un árbol filogenético para *M. tuberculosis*, describiendo una población clonal con cuatro grupos (I,II,III,IV) muy relacionados con *M. bovis*. Los grupos descritos concuerdan con los mencionados por Sreevatsan *et al.* 1997; el grupo I, III y IV relacionados con el Grupo principal 1, el grupo II relacionado con el Grupo principal 2 y 3. En relación a la distribución geográfica las cepas pertenecientes a los grupos I, II y III, estaban presentes en el sudeste de Asia, Europa y el subcontinente indio respectivamente, mientras que las cepas del grupo IV se encontraron a nivel mundial. Las cepas pertenecientes al grupo IV presentaron la región TbD1 y en su mayoría una sola copia de la secuencia de inserción IS6110, lo que sugiere una relación más cercana con el ancestro común que los otros grupos. (Baker *et al.*, 2004).

En el 2006 Gagneux *et al.* demostraron que la estructura de la población global de *M. tuberculosis* está definida por linajes filogeográficos, asociados con poblaciones humanas simpátricas específicas. Estos autores analizaron 875 cepas provenientes de 80

países mediante técnicas como Polimorfismo de Secuencia Larga (LPSs), análisis de regiones de diferencia Tb1, RD9 y secuenciación, definiendo 6 linajes y 16 sublinajes (11 sublinajes para el linaje Euro-Americano y 5 sublinajes para el linaje Este-asiático): Indo-Oceánico, Este-Asiático, Este-Africano-Indio, Euro-Americano, Oeste-Africano 1, Oeste-Africano 2. Algunos de estos linajes corresponden a cepas agrupadas previamente por Sreevatsan *et.al*, por ejemplo: el linaje Indo-Oceánico incluye cepas que han sido referidas como “ancestrales” ya que conservan la región genómica TbD1. El linaje Este – Asiático incluye cepas de la familia Beijing; los linajes Oeste – Africano 1 y 2 incluye cepas que tradicionalmente han sido nombradas como *Mycobacterium africanum* y el linaje Euro-Americano reagrupa a las cepas que han sido descritas en los grupos principales 2 y 3. Este estudio confirmó que cada linaje está relacionado con un área geográfica particular. Sin embargo, la presencia de los seis linajes en el continente africano supone el inicio de la diseminación de la enfermedad y la capacidad de adaptación del microorganismo a diferentes poblaciones humanas hospedadoras. (Gagneux 2006).(Figura 7).

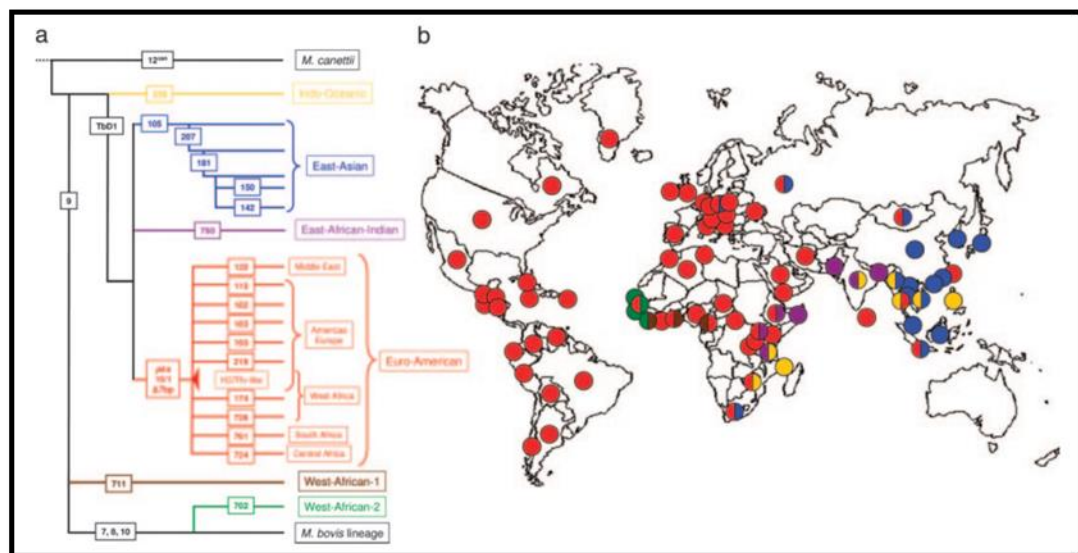


Figura 7: Distribución de los linajes de *M. tuberculosis* a nivel mundial. a) Filogenia global para *M. tuberculosis* definida por LSPs. b) Estructura geográfica de los seis principales linajes de *M. tuberculosis* (Gagneux 2006).

Una de las familias o sublinajes más estudiados ha sido la familia Beijing, denominada así porque se identificó en la provincia de Beijing – República China en 1995 (van Soolingen, 1995) y está presente también en países que forman parte de la Unión Soviética. Las cepas de esta familia pueden ser reconocidas en base a los patrones altamente conservados de spoligotyping. Se encontraron solamente 9 de las 43 secuencias espaciadoras junto con patrones característicos de RFLP-IS6110 con gran número de bandas y la presencia de un fragmento de 3,5 kb que lleva IS1081 que está asociado con la modificación de uno de los sitios de reconocimiento cromosómica PvuII en el genoma micobacteriano, dando como resultado una protección parcial para la escisión por PvuII (van Soolingen 1995; Bing Lu 2012).

Varios estudios mencionan que el genotipo Beijing está asociado con la resistencia a los medicamentos y es responsable de los brotes de TB- MDR (Glynn 2002, Cox 2005). Los genotipos de la familia Beijing muestran gran correlación con resistencia a rifampicina y ofloxacina (Pang 2012).

2. OBJETIVOS

La Tuberculosis afecta a la humanidad desde tiempos inmemoriales y se asocia a la pobreza, mala alimentación, hacinamiento e inmunodepresión, considerándose como un problema global de salud pública. Africa es el continente con mayor incidencia y el más afectado por la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Es preocupante la situación del este de Europa por las elevadas tasas de infección y de resistencia a los fármacos. En los países desarrollados, la enfermedad se está concentrando en poblaciones vulnerables, como inmigrantes y personas con exclusión social, como aquellas personas que están privadas de su libertad. En España, el aumento de la proporción de inmigrantes pone de manifiesto la necesidad de mejorar la coordinación territorial y fortalecer la vigilancia (Orcau et al., 2011). En Ecuador actualmente el Ministerio de Salud pública, junto con el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) realizan las acciones necesarias para el control de la TB en el Ecuador con énfasis en las poblaciones vulnerables.

Una de las estrategias que contribuyen a mejorar los procesos de control y vigilancia de la enfermedad es la epidemiología molecular a través de técnicas de genotipificación, las cuales han permitido discriminar los aislados de *Mycobacterium tuberculosis* a nivel de cepa en distintos contextos. En el laboratorio permite la detección de eventos de contaminación cruzada, mientras que en escenarios clínicos permite discriminar recurrencias debidas a reactivaciones o reinfecciones e identificar casos con infecciones mixtas. En el contexto micropoblacional permite identificar casos infectados por una misma cepa (transmisión reciente) y en el contexto macropoblacional permite definir la distribución internacional de linajes de *M. tuberculosis* el comportamiento de cepas de alto riesgo y también analizar aspectos evolutivos (García et al., 2011).

La técnica considerada como *gold standard* para genotipificación de *Mycobacterium tuberculosis* ha sido IS6110-RFLP, sin embargo ésta técnica es muy laboriosa y requiere un alto crecimiento bacteriano. Actualmente las técnicas más tradicionales como AFLP presentan variaciones con mejores resultados, además, se han realizado estudios multicéntricos usando otras técnicas basadas en PCR tales como VNTR, spoligotyping y MIRU-VNTR los cuales demuestran ser mas robustas.

2.1 Objetivo general

Caracterizar molecularmente aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* complex procedentes de centros hospitalarios de España y Ecuador mediante las técnicas moleculares AFLP simplificada y MIRU-VNTR.

2.2 Objetivos específicos

- Estandarizar e implementar la técnica AFLP simplificada y la técnica MIRU-VNTR para la genotipificación de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) en el servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Valencia (España) y en el Laboratorio de Biotecnología Humana de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE (Ecuador).
- Estudiar la variabilidad genética de *Mycobacterium tuberculosis* complex mediante herramientas bioinformáticas.
- Determinar la distribución de los diferentes genotipos encontrados en relación a las variables demográficas de interés.
- Determinar el poder discriminatorio de las técnicas de genotipificación.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 Origen del material biológico

Para este estudio se analizaron un total de 131 aislados clínicos de los cuales 68 aislados fueron recolectados en Ecuador, provenientes tanto del Laboratorio Clínico del Hospital Alli Causai ubicado en la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua como del Laboratorio de Bacteriología del Hospital Carlos Andrade Marín ubicado en la ciudad capital Quito, provincia de Pichincha (Figura 8.). Los 63 aislados restantes fueron recolectados en España y pertenecían a la colección de microorganismos de los Servicios de Microbiología del Consorcio Hospital General Universitario y Hospital Clínico Universitario de la ciudad de Valencia, provincia de Valencia (Figura 9.). De éstos aislados, 126 fueron identificados por métodos convencionales y moleculares como MTBC, correspondientes a 106 pacientes. Además, se incluyó la cepa control *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177 para los diferentes estudios de biología molecular.



Figura 8: Mapa de Ecuador indicando las ubicaciones de dos ciudades Quito y Ambato. Tomado de la web: <https://maps.google.com.ec/maps?hl=es>



Figura 9: Mapa de España indicando la ubicación de la ciudad de Valencia.
Tomado de la web: <https://maps.google.com.ec/maps?hl=es>

3.2 Mantenimiento y recuperación de los aislados

Los microorganismos de procedencia española objeto de estudio habían sido aislados durante un período de cuatro años (2008-2011), mediante cultivo en medio líquido (Mycobacterial Growth Indicator Tubes) en el sistema semiautomatizado Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson, Microbiology Systems, Sparks, MD) y/o en medio de Löwenstein-Jensen (Becton Dickinson) a partir de muestras clínicas de pacientes de diferentes Departamentos de Salud de la provincia de Valencia. Dichos aislados se conservaron en ultracongelador a -80°C suspendidos en solución acuosa de glicerol (Merck, Darmstadt) al 10% (v/v) (Tison *et Carbonelle*, 1972). Para comprobar la viabilidad y pureza de los aislados seleccionados, se llevó a cabo su descongelación e inoculación en medio sólido de Löwenstein Jensen, que fue incubado en estufa de atmósfera convencional a 37°C durante 15 días. Cuando se observó un crecimiento óptimo, con presencia de colonias diferenciadas, se corroboró la pureza de los cultivos mediante microscopía tras tinción de Ziehl-Neelsen. Se prepararon nuevas réplicas de los cultivos en agua glicerinada al 10% (v/v) para conservarse en ultracongelador a -80°C hasta la extracción del material genético para realizar los ensayos moleculares.

Los microorganismos que procedían de Ecuador fueron aislados a partir de muestras clínicas de pacientes durante el período 2006 a 2013. En este caso, se partió de cepas conservadas en ultracongelador a -80°C , en forma de suspensiones celulares en solución acuosa de glicerol al 10% (v/v) y de aislados en cultivo de Löwenstein Jensen cedidos por los Centros de Salud, los cuales se dividieron en dos alícuotas; una que fue suspendida en solución acuosa de glicerol al 10% (v/v) y almacenada en ultracongelador a -80°C creando así una colección de cepas y la otra alícuota se destinó para la extracción del material genético (ADN).

3.3 Identificación molecular de aislados a nivel de especie (GenoType® MTBC)

Para la identificación a nivel de especie de las cepas incluidas en nuestro estudio (aislados clínicos recolectados en España) y la cepa control *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177 se utilizó el ensayo GenoType® MTBC (HAIN LIFESCIENCE).

El procedimiento completo consta de tres pasos: extracción de ADN procedente de cultivo, una fase de amplificación multiplex con *primers* marcados con biotina y una fase de hibridación inversa. Los ensayos se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante del siguiente modo:

3.3.1 Extracción de ADN:

Se llevó a cabo mediante un procedimiento de lisis térmica, para lo cual se resuspendieron dos colonias del medio de Löwenstein Jensen en 300 μl de agua destilada estéril. La suspensión bacteriana obtenida fue inactivada mediante calentamiento a 95°C durante 20 minutos en un bloque térmico (Twin incubator DG-210, Diagnostic Grifols S.A). Luego, se incubó en baño ultrasónico (ElmaSonic S30) durante 15 minutos, se centrifugó cinco minutos a $13.000 \times g$ y se transfirió el sobrenadante a un tubo *Eppendorf* estéril (Sarstedt, Aktiengesellschaft & Co, Nümbrecht, Germany) y se almacenó a -20°C .

3.3.2 Amplificación:

Se realizó en tubos *Eppendorf* estériles de 200 μl de capacidad (0,2 ml Thermotube, ABgene, Epsom, Surrey) para un volumen final de reacción de 50 μl que

incluía: 5 µl de ADN, 5 µl del tampón de amplificación (10X)(HAIN LIFESCIENCE), 2 µl de MgCl₂ (HAIN LIFESCIENCE), 3 µl de agua destilada estéril, 0,2 µl de HotStart-Taq®DNA Polymerase (HAIN LIFESCIENCE) y 35 µl de PMN Mix (Mezcla del Primer/Nucleótido). Se programaron en el termociclador (A@TEFACTindustriekulture) bajo las condiciones siguientes: i) un ciclo inicial de 15 minutos a 95°C ii) 10 ciclos de 30 segundos a 95°C y 2 minutos a 58°C iii) veinte ciclos de 25 segundos a 95°C, 40 segundos a 53°C, 40 segundos a 70°C iv) un ciclo de 8 minutos a 70°C v) un periodo final indefinido a 4°C.

3.3.3 Hibridación:

La hibridación incluye etapas de desnaturalización química del producto a amplificar, hibridación de amplicones en una sola cadena marcados con biotina a sondas unidas a membrana, lavado astringente, adición de conjugado de fosfatasa alcalina/streptavidina (AP), y una reacción de tinción mediada por (AP). Una plantilla asegura la interpretación sencilla y rápida del esquema de bandas obtenido. En todas las ocasiones, el proceso se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. El tampón de hibridación (HYB) y la solución de lavado astringente (STR) se precalentaron a 37°C-45°C y se prepararon las diluciones del conjugado concentrado (1:100 v/v) y del sustrato concentrado (1:100 v/v) con sus tampones respectivos. Para cada tira de nitrocelulosa se añadieron 10 µl de concentrado a 1 ml de los respectivos tampones. Se dispensó un volumen de 20 µl de la solución de desnaturalización en un extremo de cada uno de los pocillos usados y se añadió 20 µl de la muestra amplificada homogenizando mediante pipeteo; se dejó incubar la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se colocó la bandeja en el equipo *Auto-LiPA* (Innogenetics N.V., Ghent, Belgium), el cual permite mediante ciclos de calentamiento - enfriamiento, aspiración y pipeteado ejecutar en su totalidad las fases de hibridación, lavado astringente y desarrollo de la coloración, seleccionando un programa específicamente diseñado para ello. La lectura e interpretación de los resultados se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. De este modo, se emplearon las plantillas suministradas por el fabricante, donde se fijan las tiras de nitrocelulosa reveladas en los campos marcados, quedando alineadas la banda del Control de Conjugado (CC) y la banda del Control Universal (UC) con las respectivas líneas del formato. Se anotó el número de las bandas positivas y se determinó la especie con la ayuda de la tabla de interpretación (Figura 10.)

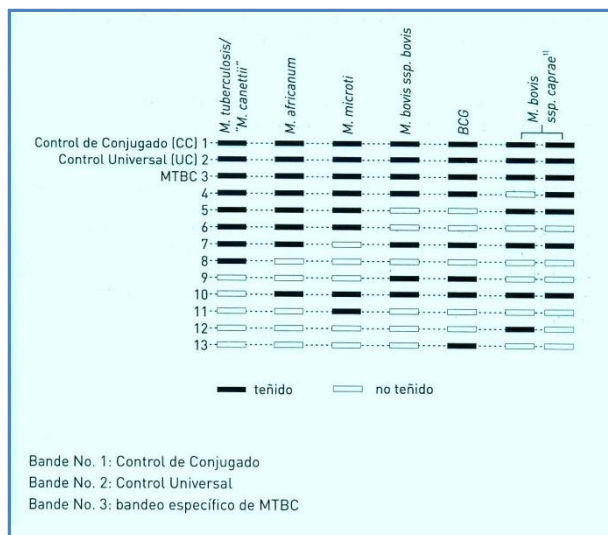


Figura 10.- Interpretación del ensayo GenoType® MTBC

3.4 Identificación del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante BD MGIT Tbc Identification Test.

Para el caso de los aislados clínicos de Ecuador no se pudo realizar la técnica comercial GenoType® MTBC por motivos de financiación, por lo que se buscó un método alternativo: el dispositivo BD MGIT™ Tbc identification test (BD), que es una técnica inmunocromatográfica rápida que permite la detección cualitativa del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

Para realizar este ensayo se sembraron 25 µL de suspensión glicerizada congelada de cada aislado clínico y de la cepa control H37Ra conservados a -80°C en 250 µl de medio líquido Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) y se incubaron en estufa de atmósfera convencional a 37°C durante 12 días. Tras este período de incubación y tras comprobar mediante tinción de Ziehl Neelsen que existía crecimiento puro de bacilos ácido alcohol resistentes, se continuó el procedimiento de análisis, lectura e interpretación de los resultados según las instrucciones aportadas por el fabricante (Figura 11):

- El dispositivo BD MGIT Tbc se extraía de la bolsa de papel metalizado justo antes de realizar el análisis y se colocaba en una superficie plana.
- Se rotulaba un dispositivo para cada muestra que se iba a analizar con su código de identificación.
- Se mezclaba bien la muestra por inversión suave del tubo.
- Se retiraba el tapón del tubo y, con una punta de pipeta estéril, se pipeteaba 100 μ L de muestra en el pocillo del dispositivo.
- Se establecía el tiempo con un temporizador en 15 minutos
- Transcurridos los 15 minutos, se leía y registraba el resultado.

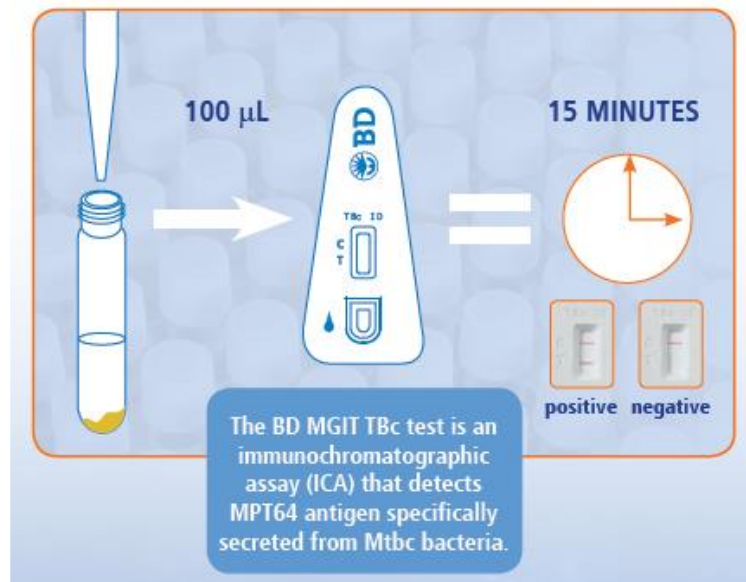


Figura 11.- Esquema de la realización de la técnica (BD).

Se emplearon los criterios de interpretación de los resultados aportados por el fabricante:

- **Análisis positivo para MTBC (presencia de antígeno MPT64):** aparece una línea de color rosa-rojo en las posiciones “T” (análisis) y “C”(control) de la ventana de lectura. Esto indica que el análisis ha detectado antígeno MPT64 en la muestra. La intensidad de las líneas en las posiciones C y T puede variar. El color del área de fondo debe ser entre blanco y rosado claro.

- **Análisis negativo para MTBC (no se detecta antígeno MPT64):** no aparece una línea de un color rosa-rojo en la posición “T” (análisis) de la ventana de lectura. Esto indica que el análisis no ha detectado antígeno MPT64 en la muestra. Una línea en la posición “C” (control) de la ventana de lectura indica que el procedimiento de análisis se ha llevado a cabo de forma correcta. El color del área de fondo debe ser entre blanco y rosado claro.
 - **Análisis no válido:** el análisis no es válido si no aparece una línea de color rosa-rojo en la posición “C” (control) de la ventana de lectura o si el color del área de fondo impide la interpretación del análisis.

3.5 Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados: AFLP

El análisis mediante AFLP se realizó con todos los aislados clínicos y la cepa control *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177 siguiendo los procedimientos descritos por Viader-Salvadó et al. (2009) incluyendo modificaciones aportadas por el protocolo de Gaafar et al. (2003). Se realizaron una serie de ensayos iniciales, con el fin de encontrar las condiciones óptimas para llevar a cabo el análisis AFLP. Para ello, se seleccionaron aleatoriamente cinco cepas pertenecientes a distintos pacientes y se realizaron mínimas modificaciones siguiendo los protocolos citados hasta conseguir las condiciones idóneas para el ensayo.

3.5.1 Preparación de la biomasa y lisis celular

Los *stocks* congelados correspondientes a los aislados en estudio fueron sembrados en medio de Löwenstein-Jensen e incubados a 37°C en atmósfera convencional durante 15 días, hasta conseguir un crecimiento óptimo. De los cultivos obtenidos se tomaron dos asas bacteriológicas y se resuspendieron en 400 µl de solución TE 1X (Tris-HCl 1.0 M pH 8; EDTA 0.1 M, SERVA Electrophoresis) La suspensión fue inactivada mediante calentamiento durante 20 minutos a 80°C, y transcurrido este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente por 15 minutos. Luego se adicionó 50 µl de lisozima (10mg/ml) (Sigma-Aldrich Co) se homogenizó la mezcla mediante inversión suave y se incubó durante 18 horas a 37°C. Se añadió un volumen de 75 µl de solución preparada fresca de SDS (Sigma-Aldrich Co) al 10% (p/v) y 20 µl de Proteinasa K (20

mg/ml) (Sigma-Aldrich Co), se homogenizó mediante vórtex y se incubó durante 10 minutos a 65°C con agitación por inversión constante. Finalmente, se añadió a la solución anterior, 100 µl de NaCl 5M (PanReac Química S. A) y 100 µl de CTAB/NaCl (Sigma-Aldrich Co) precalentada a 65°C. Se agitó la mezcla vigorosamente hasta obtener un aspecto lechoso y se incubó durante 10 minutos a 65°C.

3.5.2 Extracción de ADN genómico

Para la purificación y precipitación del ADN, a la solución obtenida en el proceso de lisis se le añadieron 750 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) (Sigma-Aldrich Co) y la suspensión se mezcló con agitación vigorosa durante 10 segundos. Luego se centrifugó (*Eppendorf* Centrifuge 5415 D) durante ocho minutos a 13000 rpm a temperatura ambiente. Se transfirió la fase acuosa superficial obtenida tras la centrifugación a un nuevo tubo *eppeendorf* estéril (Sarstedt, Aktiengesellschaft & Co) y se añadió isopropanol frío (Panreac Química S.A) 1:0,6 (v/v). Para hacer precipitar el ADN, se realizaron movimientos de inversión lenta y luego se dejaron a -20°C durante 30 minutos, luego de los cuales se centrifugaron a 13.000 rpm por 15 minutos. Tras desechar cuidadosamente el sobrenadante, se lavó el sedimento con 1 ml de etanol frío 70% (Panreac Química S.A) (conservado a -20°C) mezclando mediante movimientos de inversión, se centrifugó nuevamente durante 5 minutos a 13000 rpm, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el sedimento por completo mediante evaporación del etanol a temperatura ambiente o con aire seco a 37°C en incubador durante 15 minutos. El sedimento fue resuspendido en 50 µl de TE 1X, se incubó a 37°C durante una hora en baño maría y se conservó a -80°C hasta el momento de su uso.

3.5.3 Cuantificación de la concentración de ADN

Se realizó mediante lectura de la densidad óptica de cada muestra utilizando el espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific) y las concentraciones se ajustaron a 200 ng/µl.

3.5.4 Restricción enzimática

Se empleó una endonucleasa de restricción *XhoI* (Roche) que reconoce y corta la secuencia 5´C/TCGA G 3´. De esta manera, 200 ng/µl de DNA genómico fueron tratados

con 10 U de *Xho*I durante 2 horas a 37°C en un volumen final de reacción de 25 µl que contenía 2,5 µl de buffer 10X y agua bidestilada estéril. El ADN digerido fue conservado a 4°C hasta el momento de su utilización.

3.5.5 Preparación de adaptadores de doble cadena

Se utilizaron los oligonucleótidos XA-1 (GTAGACTGCGTACATGCA) (TIB-MOLBIOL) y XA-2 (TCGATGCATGTACGCAGT) (TIB-MOLBIOL) que fueron preparados semanalmente colocando 25 µM de cada uno en 5 µl de tampón PCR 10X para un volumen final de 50 µl. Esta mezcla fue calentada a 90°C durante cinco minutos y la hibridación se realizó mediante enfriamiento en termociclador (A®TEFACTindustriekulture) desde 90°C hasta 4°C, con una disminución térmica (ramp) de 1°C/min. Los adaptadores de doble cadena obtenidos, fueron conservados en nevera a 4°C durante un período de tiempo no superior a una semana.

3.5.6 Ligación de los adaptadores al ADN digerido e inactivación de la T4 ligasa

Para la reacción de ligación se usó 15 µl de ADN digerido con el adaptador a una concentración final de 2,5 µM y 1U de T4 DNA ligasa (Roche) en un volumen final de reacción de 25 µl durante 17 horas a 12°C. La T4 DNA ligasa fue luego inactivada térmicamente a 65°C durante 10 minutos, luego se adicionó 40 µl de agua destilada estéril y se almacenó a -20°C hasta su utilización en la PCR.

3.5.7 Reacción en cadena de la polimerasa

Para la reacción de amplificación se preparó una solución *master mix* para un volumen final de reacción de 25 µl que contenía tampón de PCR 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM dNTPs, 6,0 µM XP-G primer (TGCGTACATGCATCGAGG) (TIB-MOLBIOL), 2 U de Hot Star Taq DNA polimerasa (HAIN Lifescience) y se adicionaron 4,2 µl de la solución de ADN digerido y ligado. Se definieron en el termociclador las temperaturas de desnaturalización, alineamiento y extensión, siguientes: i) un ciclo inicial de 2 minutos a 72°C; ii) dieciséis ciclos de 20 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C y 2 minutos a 72°C; iii) diecinueve ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C, 2 minutos a 72°C; iv)

un período de extensión final de 30 minutos a 60°C. Los amplificadores fueron conservados a 4°C hasta su utilización.

3.5.8 Electroforesis y visualización de los fragmentos amplificados

Los amplicones obtenidos en España, fueron separados mediante electroforesis horizontal (Power Pac 300, Bio-Rad Laboratories) (Maxicell EC 360 M Electrophoretical System, EC Apparatus Corporation) en un gel de agarosa SERVA al 1.5% (p/v) en tampón TBE 1X a 55 voltios durante 2h30 min. En cada análisis se incluyó un marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen TrackIt 100 bp DNA Ladder). Los geles fueron revelados con una solución de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich Co) (0,5 µg/mL) durante 20 minutos; para la identificación de las bandas se utilizó un sistema de visualización de geles (SYNGENE, modelo G:box CHEMI HR) que consta de un transiluminador de luz ultravioleta que permite guardar las fotografías en un software para su posterior análisis.

En el caso de Ecuador se utilizó SYBR safe como agente intercalante de ADN a una concentración de 0,1 ul/ml.

3.5.9 Análisis e interpretación

El tamaño relativo de los fragmentos fue calculado mediante el programa informático Bio-1D++ versión 11.11 Software serial 10-630365 (Vilber Lourmat); la similitud entre los aislados se calculó según el coeficiente de Dice para la obtención de las matrices y los dendogramas de homología.

El criterio seguido para establecer diferencias entre los patrones de AFLP obtenidos, fue considerar aislados iguales a aquellos que tenían el mismo número y tamaño de fragmentos, y diferentes aquellos cuyos perfiles diferían en uno o más fragmentos (Gaafar *et al.*, 2003). (Figura 12.)

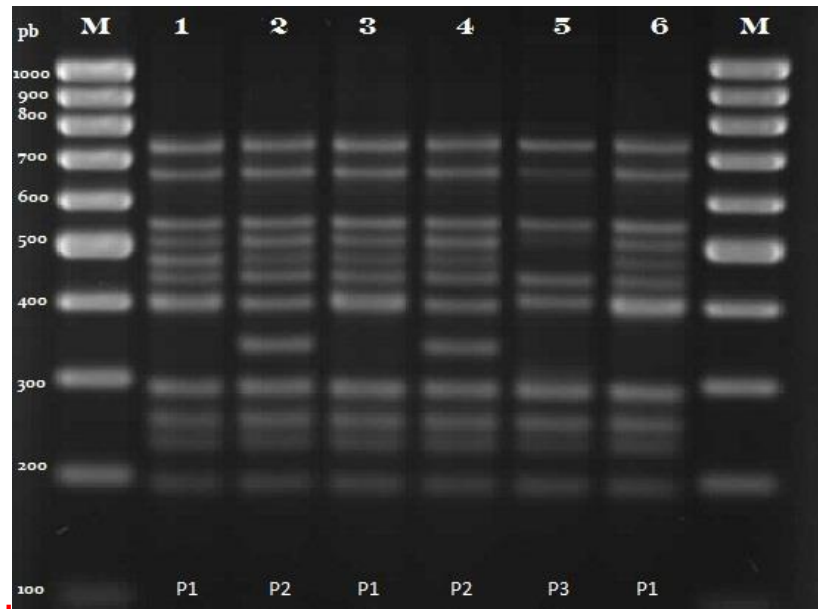


Figura 12. Patrones AFLP para *M. tuberculosis* complex: gel de agarosa con distintos patrones de bandas AFLP de 6 aislados clínicos de *M. tuberculosis*; Carril 1 y 8, M marcador de peso molecular 1000Kb, carriles 2 al 7 diferentes patrones de bandas AFLP provenientes de diferentes aislados clínicos.

3.5.10 Estudio del poder discriminatorio de la técnica

El poder discriminatorio del método se calculó según el índice de diversidad de Simpson (Dillon *et al.* 1993). Hunter and Gaston (1988) definen el poder discriminatorio de un método de tipificación como su capacidad para distinguir entre cepas no relacionadas. El índice viene dado por la siguiente ecuación:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j-1)$$

Donde “N” es el número total de cepas de la muestra, “s” es el número total de tipos descritos y “n_j” es el número de cepas que pertenecen al tipo “j”. Esta ecuación puede ser aplicada tanto para la comparación directa del poder de discriminación de diferentes métodos de tipificación, como para el análisis del poder de discriminación de

esquemas de tipificación combinados. Según consideran Hunter & Gaston (1988), el nivel aceptable de discriminación dependerá en cada caso de un gran número de factores, pero un índice mayor del 0,90 sería lo deseable, para que los resultados puedan ser interpretados con confianza.

3.6 ENSAYO CON MIRUs – VNTR

La técnica MIRU-VNTR se estandarizó tomando en cuenta la metodología propuesta por Supply (2005), se escogieron 15 loci MIRU-VNTR (Tabla 1.) que presentan mayor poder discriminatorio (Comas *et. al.* 2009). Se realizó PCR individual para cada MIRU y se visualizó los amplicones en geles de agarosa y electroforesis horizontal.

LOCUS	ALIAS
580	MIRU 04
2996	MIRU 26
802	MIRU 40
960	MIRU 10
1644	MIRU 16
3192	MIRU 31
424	VNTR 42
577	VNTR 43
2165	VNTR ETRA
2401	VNTR 47
3690	VNTR 52
4156	VNTR 53
2163b	VNTR QUB-11b
1955	VNTR 1955
4052	VNTR QUB-26

Tabla 1. Listado de los loci MIRU-VNTR utilizados en el estudio

3.6.1 Reacción en cadena de la Polimerasa

La amplificación de cada locus se realizó mediante reacciones individuales, utilizando betaína en lugar de solución Q. La preparación de la solución master mix se la hizo de forma manual con los volúmenes de reactivos descritos en la Tabla 2., la principal variante fue la concentración de $MgCl_2$ (3, 2 y 1.5 mM) específica para cada locus al igual que los primers.

MIRU-VNTR	4-26-40-47 52-53	10-16-31	42-43-ETRA- QUB-11b 1955-QUB-26
MgCl₂ concentración final	3 mM	2 mM	1,5 mM
H ₂ O Ultra Pura	9,10	9,50	9,70
Buffer 10 X	2,00	2,00	2,00
Betaína 5mM	4,00	4,00	4,00
MgCl ₂ 50 mM	1,20	0,80	0,60
DNTP 5 mM	0,80	0,80	0,80
Reverse primer 20 pmol/μl	0,40	0,40	0,40
Forward primer 20 pmol/μl	0,40	0,40	0,40
Hotstart DNA polimerasa 5 U/μl	0,10	0,10	0,10
Total master mix	18,00	18,00	18,00

Tabla 2 .- Volúmenes (μl) para preparar la master mix de las PCR individuales

Se dispensó 18 ul de la solución master mix en cada microtubo y luego se añadió 2 μl de ADN genómico purificado (5 ng/μl). El programa utilizado en el termociclador (Thermo) es el que se describe en la Tabla 3.

ETAPA	TEMEPRATURA	TIEMPO	CICLOS
Denaturación inicial	95 °C	15 min	
Denaturación	94°C	1 min	40
Hibridación	59°C	1 min	
Extensión	72°C	1 min 30 sec	
Extensión final	72°C	10 min	
∞	4°C		

Tabla 3. Programa de amplificación MIRU-VNTR

Una vez estandarizados los quince MIRU's con la cepa control (*Mycobacterium tuberculosis* H37Ra 25177) se analizó un MIRU a la vez para todas las cepas del estudio y en cada ensayo de PCR se añadió el control positivo.

3.6.2 Electroforesis y visualización de los fragmentos amplificados

Los amplicones fueron separados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa preparados al 1.5% (p/v) en tampón TBE 1X y con bromuro de etidio (0,5 ul x 10 ml de gel) o SYBR safe a una concentración de 0,1 ul/ml de gel.

En cada pocillo se colocó 10 ul de amplicón previamente homogenizado con 3 ul de buffer de carga, además se incluyó un marcador de peso molecular de 100 pb (Trackit 100 bp DNA Ladder) en los pocillos de los extremos y en la mitad del gel para detectar posibles migraciones con efecto sonrisa. La migración electroforética se realizó a 100 voltios por cuatro horas.

Para la identificación de las bandas se utilizó un sistema de visualización de geles (SYNGENE, modelo G:box CHEMI HR).

3.6.3 Análisis e Interpretación

Para determinar el tamaño de los fragmentos, se comparó la altura de la banda obtenida para la cepa control H37 Ra 25177 con las bandas del marcador de peso molecular de 100 pb y con la banda de cada aislado clínico analizado.

Para determinar el número de copias para cada VNTR se utilizó la tabla alélica para la genotipificación de H37Rv/Ra (Supply 2005) verificando en primera instancia que la asignación alélica para la cepa control H37Ra sea la correcta y luego comparando para cada VNTR el tamaño del fragmento amplificado desde el más pequeño y su correspondiente asignación alélica (Figura 13 y Tabla 4.). Los datos obtenidos corresponden a un código numérico formado por 15 dígitos para cada aislado clínico los cuales fueron almacenados en una hoja de cálculo Excel.

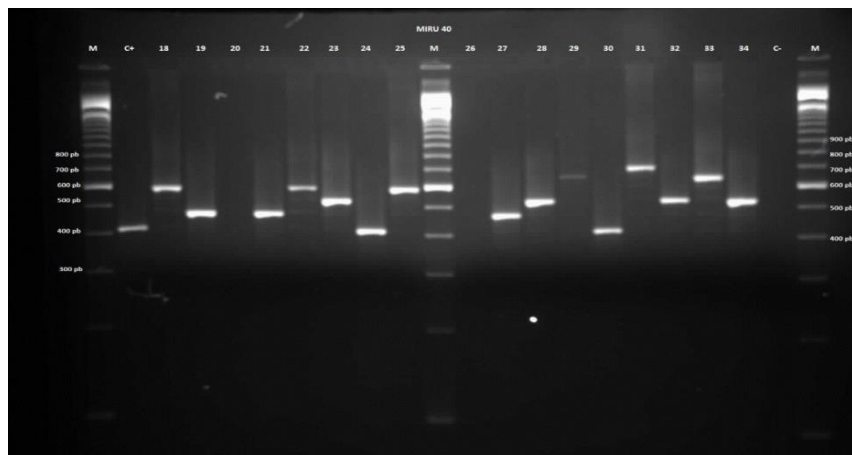


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los amplicones obtenidos para el MIRU 40.

CARRIL	MUESTRA	PESO MOLECULAR	ALELOS MIRU 40
1	Marcador de peso molecular		
2	C+ H37Ra		
3	18	570	4
4	19	462	2
5	20	624	5
6	21	462	2
7	22	570	4
8	23	516	3
9	24	408	1
10	25	570	4
11	Marcador de peso molecular		
12	26	408	1
13	27	462	2
14	28	516	3
15	29	678	6
16	30	408	1
17	31	678	6
18	32	516	3
19	33	624	5
20	34	516	3
21	C -		
22	Marcador de peso molecular		

Tabla 4. Interpretación de resultados, asignación de alelos para MIRU 40.

Para elaborar los dendogramas se utilizó la herramienta on line <http://www.miru-vnrplus.org> con la cual se estableció el número de *clusters* y patrones únicos utilizando el coeficiente de DICE y el método UPGMA.

3.6.4 Estudio del poder discriminatorio de la técnica

El poder discriminatorio del método se calculó según el índice de diversidad de Simpson (Dillon *et al.* 1993), tal y como definimos en el estudio mediante AFLP. El índice viene dado por la siguiente ecuación:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j-1)$$

Donde “N” es el número total de cepas de la muestra, “s” es el número total de tipos descritos y “n_j” es el número de cepas que pertenecen al tipo “j”. Según Hunter & Gaston (1988), el poder discriminatorio de un método de tipificación, es decir su capacidad para distinguir entre cepas no relacionadas dependerá en cada caso de un número variable de factores, pero un índice mayor del 0,90 sería lo deseable, para que los resultados puedan ser interpretados con confianza.

4. RESULTADOS

4.1 Descripción de la población en estudio

4.1.1 Año de Aislamiento:

Los microorganismos objeto de este estudio fueron aislados a partir de muestras clínicas de pacientes obtenidas durante los años 2006, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012 y 2013 en el caso de Ecuador (68 aislados en total) y durante los años 2008, 2009, 2010 y 2011 en el caso de España (63 aislados en total), siendo descrita la distribución según los años de obtención en la Figura 14.

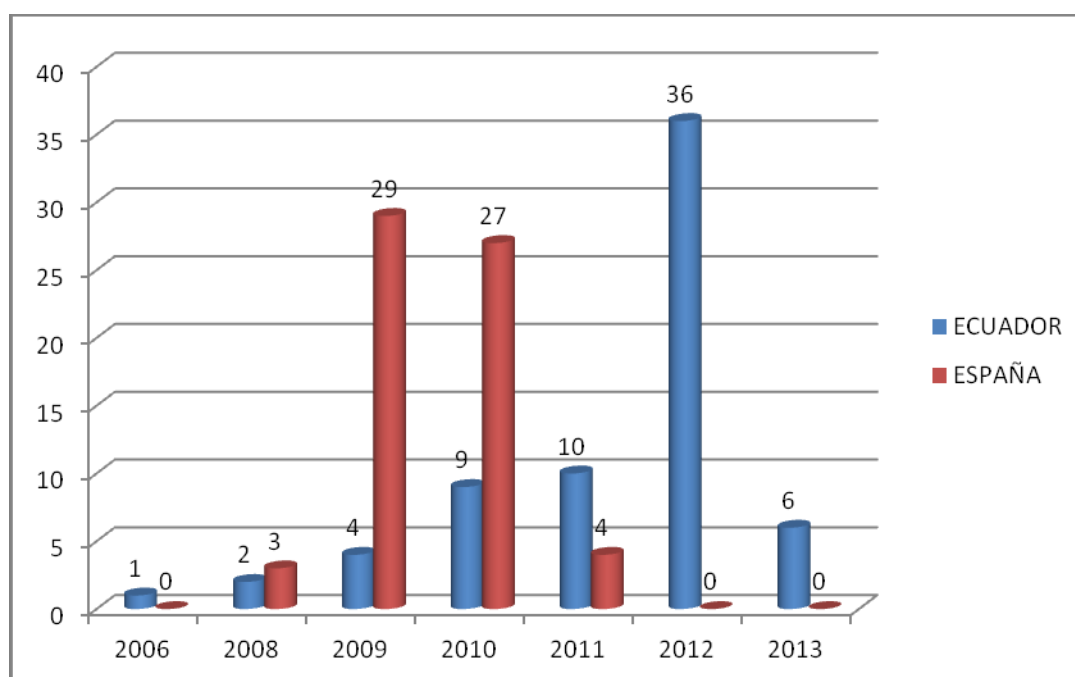


Figura 14: Número de aislados clínicos por año de obtención.

4.1.2 Género:

Los aislados clínicos procedían de pacientes de ambos sexos, aunque se observa cierto predominio del género masculino con el 64,12% del total, frente al género femenino con un 35,11%. Figura 15.

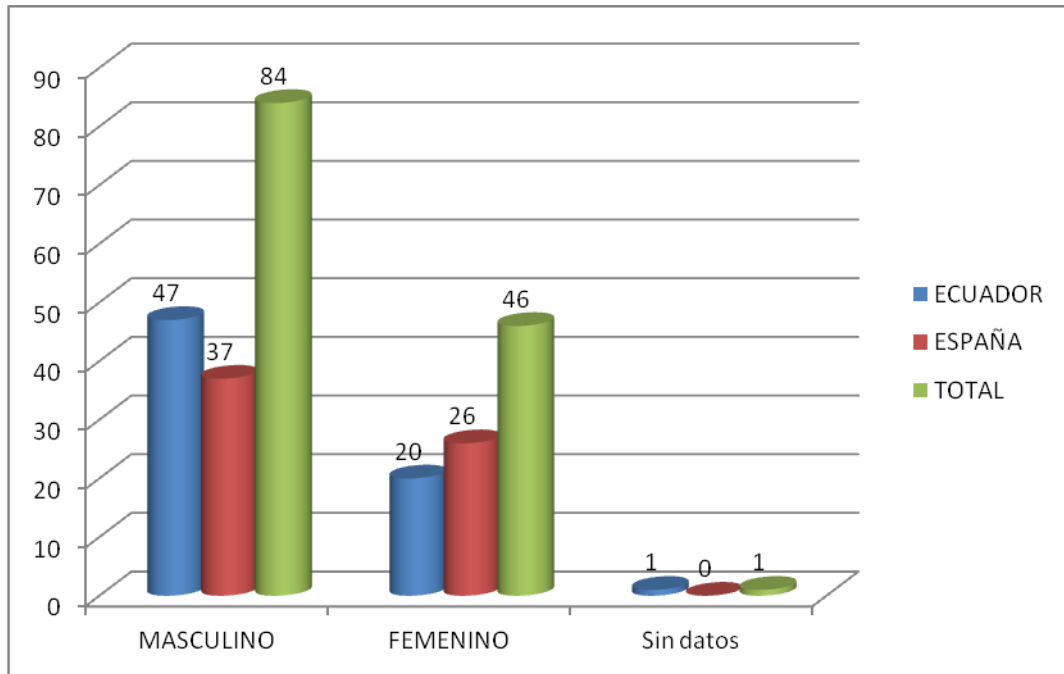


Figura 15: Distribución de los aislados clínicos por género.

4.1.3 Edad:

La distribución de los pacientes por intervalos de edad demuestra un predominio de los grupos etarios correspondientes a los intervalos 31 a 40 años (23%) y 41 a 50 años (18%). Figura 16.

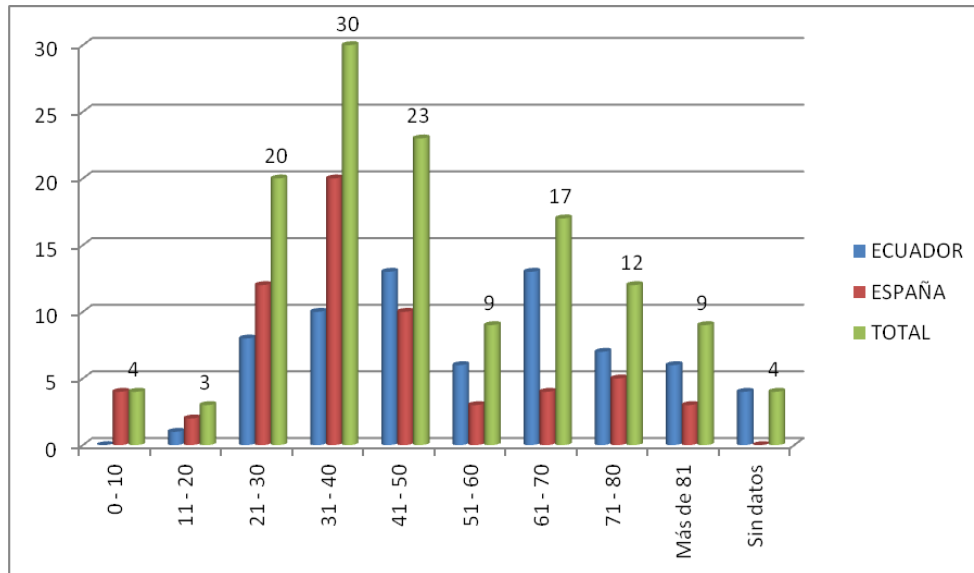


Figura 16: Distribución de los aislados clínicos por grupos etarios

4.1.4 Origen de las muestras:

Las muestras clínicas de origen respiratorio (esputo, aspirado bronco-alveolar, líquido pleural, esputo inducido, biopsia pleural y jugo gástrico) representaron el 69,47% y las muestras extra - respiratorias (orina, pus, biopsia, líquido cefalorraquídeo, heces, sangre) representaron el 30,53%. Figura 17.

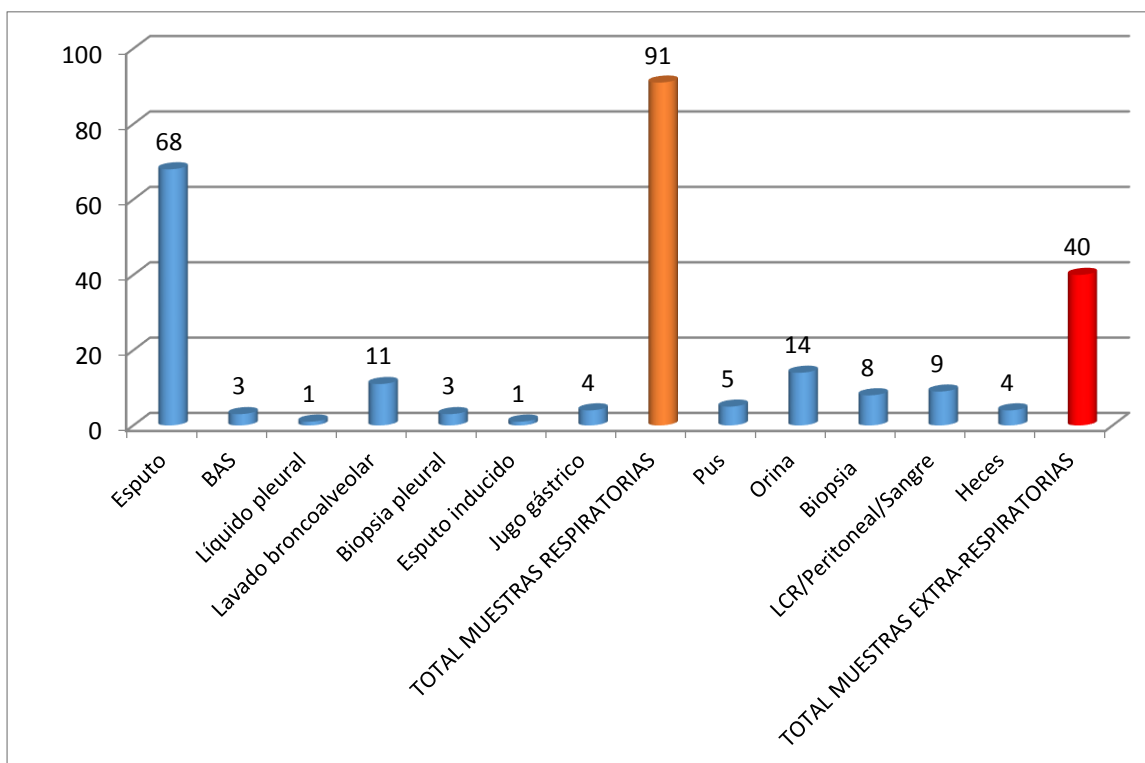


Figura 17: Origen de las muestras clínicas.

4.2 Identificación fenotípica de los aislados clínicos

El estudio de las características morfo-culturales demostró que todos los aislados clínicos incluidos en el estudio se caracterizaban por crecer adecuadamente a 37°C en atmósfera convencional, en medio de cultivo específico para micobacterias (Löwenstein-Jensen). Todos los aislados identificados como pertenecientes a la especie *M. tuberculosis* presentaron colonias de color beige, esféricas, secas, rugosas, opacas, polimorfas y de dimensiones variables, lo que permitió saber que se trataban de cepas puras y viables. Estas características fenotípicas fueron las desarrolladas y observadas por la cepa control *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177. (Figura 18)

Las cepas identificadas como *M. bovis* BCG y *M. africanum*, presentaron un crecimiento disgónico, con colonias de tamaño más pequeño y aspecto liso, menos seco.

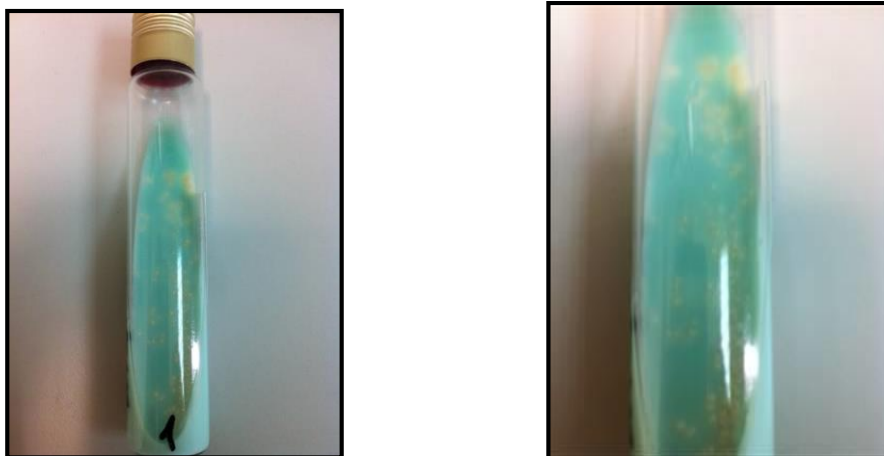


Figura 18: Cultivo Löwenstein- Jensen – cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

4.3 Identificación molecular mediante Genotype® MTBC

La tecnología DNA-STRIP permitió en base a los polimorfismos genéticos de la girasa B, identificar genéticamente a las especies *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium tuberculosis* correspondientes a los aislados clínicos españoles incluidos en el estudio y a la cepa control de la siguiente manera:

La realización del ensayo de hibridación inversa Genotype® MTBC permitió constatar que los todos los aislados clínicos españoles y la cepa control *M. tuberculosis* ATCC 25177 hibridaron con las sondas 1 (control de conjugado), 2 (control universal), y 3 (MTBC, específica de todas las especies comprendidas dentro del complejo *Mycobacterium tuberculosis*). Los aislados clínicos identificados como *M. bovis* BCG hibridaron además con las sondas 4, 7, 9, 10 y 13 (Figura 18); los aislados correspondientes a *M. africanum* hibridaron con las sondas 4, 5, 6, 7 y 10 (Figura 19) y la cepa *M. tuberculosis* ATCC 25177 junto con los aislados clínicos identificados como *M. tuberculosis* hibridaron con las sondas 4, 5, 6, 7, y 8 (Figura 19 y 20).

Así, de los 63 aislados clínicos estudiados, 2 aislados clínicos (3,17%) dieron un patrón de hibridación inversa correspondiente a *Mycobacterium bovis* BCG, 6 aislados

clínicos (9,52%) presentaron un patrón de hibridación concordante con *Mycobacterium africanum* subtipo I y 55 aislados clínicos (87,30%) fueron identificados como *Mycobacterium tuberculosis* al igual que la cepa control *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177.

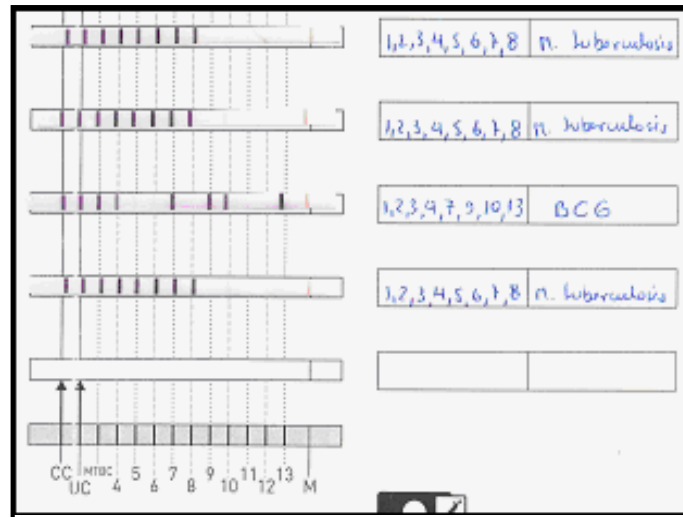


Figura 19. Lectura e interpretación de la técnica GenoType® MTBC : Identificación de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG



Figura 20. Lectura e interpretación de la técnica GenoType® MTBC: Identificación de *M. tuberculosis* y *M. africanum*.

4.4 Identificación mediante ensayo BD MGIT TBc

Esta herramienta de inmunoanálisis cromatográfico que utiliza como diana la detección de la fracción proteica micobacteriana MPT64, permitió identificar 63 de las 68 cepas aisladas en Ecuador como pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*; las 5 cepas restantes presentaron un resultado negativo para esta prueba y ante la imposibilidad de acceder en Ecuador a la técnica GenoType® MTBC debido a la limitación de recursos económicos, se decidió que dichas cepas debían ser descartadas del estudio de genotipado mediante AFLP y MIRU-VNTR. La cepa control *M. tuberculosis* ATCC 25177 también dio un resultado positivo con esta técnica de inmunocromatografía rápida. (Figura 21, Figura 22 y Tabla 5).



Figura 21. Ensayo BD MGIT TBc para la cepa control ATCC 25177

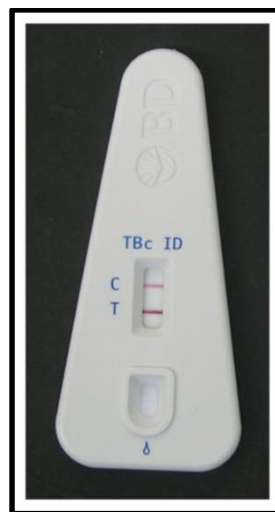


Figura 22. Ensayo BD MGIT TBc para cepa ECU 6

Ensayo BD MGIT TBc			
POSITIVO		NEGATIVO	
N° Aislados	%	N° Aislados	%
63	92,64	5	7,36

Tabla 5. Ensayo BD MGIT TBc realizado en aislados clínicos procedentes de Ecuador.

4.5 Estandarización de Técnicas de Genotipificación

4.5.1 Análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP)

Los perfiles de restricción obtenidos con el único *primer* XP-G fueron polimórficos y su análisis permitió definir patrones de restricción y agrupar los aislados atendiendo al grado de homología que tenían entre sí.

En todos los casos, las reacciones de amplificación fueron óptimas, siendo posible determinar el perfil AFLP de todas las cepas incluidas en el estudio (126 cepas), con lo que la tipabilidad de la técnica con este *primer* fue del 100%.

La cepa *M. tuberculosis* ATCC 25177, que fue utilizada como control en los ensayos mostró siempre el mismo perfil de restricción; los ensayos de repetición con cinco cepas que se seleccionaron al azar permitieron constatar que los aislados seleccionados mostraban el mismo patrón de bandas, asegurando la reproducibilidad de la técnica. Además se incluyeron en cada ensayo dos controles negativos: uno con ADN sin digerir y sin ligar con la finalidad de poder detectar cualquier posible banda resultante de la hibridación del cebador al ADN genómico y no al adaptador XA; el otro control negativo fue una muestra de agua destilada desionizada estéril sin ADN blanco para

detectar posibles artefactos generados a partir del cebador o problemas de contaminación, obteniéndose siempre resultados negativos para estos controles.

Con el iniciador XP-G se obtuvieron patrones con un mínimo de siete y un máximo de doce fragmentos de restricción con tamaños comprendidos entre 140 pb y 760 pb. (Figura 23, 24 y 25).

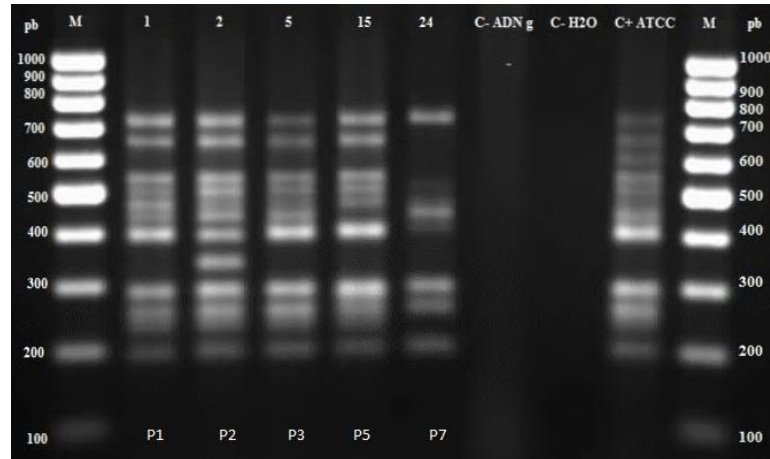


Figura 23. Perfiles de restricción AFLP obtenidos con el primer XP-G para distintos aislados clínicos de *M. tuberculosis*. Carril 1 y 10: M, marcador de peso molecular de 1000 Kb. Carriles 2 al 6: perfiles de restricción de AFLP de distintos aislados clínicos. Carril 7: control negativo con ADN genómico sin digerir ni ligar. Carril 8: control negativo sin ADN. Carril 9: Perfil de restricción de la cepa de *M. tuberculosis* ATCC 25177

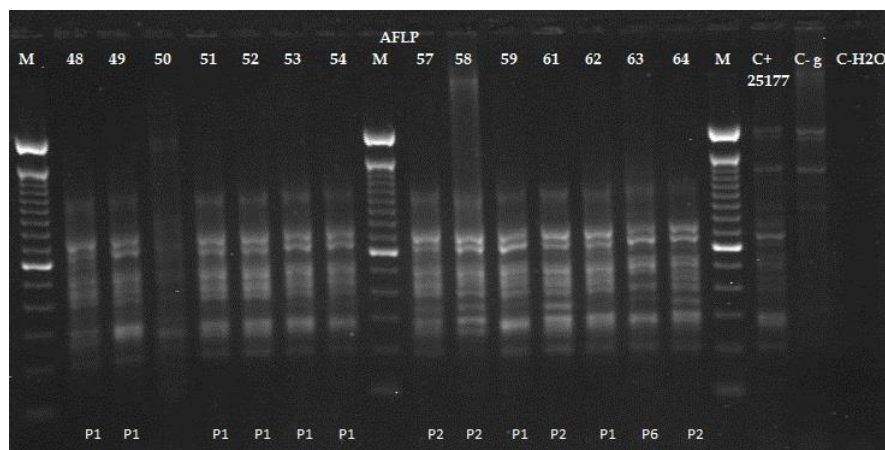


Figura 24. Perfiles de restricción AFLP obtenidos con el primer XP-G para distintos aislados clínicos de *M. tuberculosis*. Carril 1, 9 y 17: M, marcador de peso molecular de 100 pb. Carriles 2 al

8 y 10 al 16: perfiles de restricción de AFLP de distintos aislados clínicos. Carril 18: Perfil de restricción de la cepa de *M. tuberculosis* ATCC 25177. Carril 19: Control negativo con ADN genómico sin digerir ni ligar. Carril 20: Control negativo sin ADN

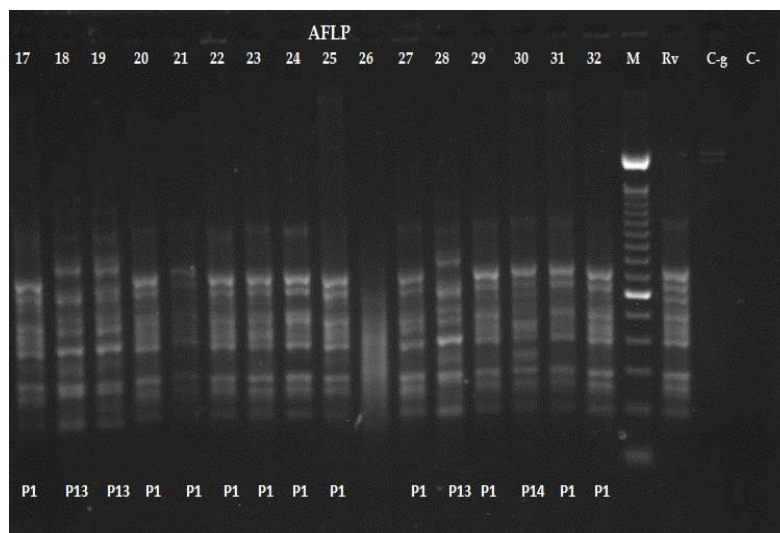


Figura 25. Perfiles de restricción AFLP obtenidos con el primer XP-G para distintos aislados clínicos de *M. tuberculosis*. Carril 17: M, marcador de peso molecular de 100 pb. Carriles 1 al 16: perfiles de restricción de AFLP de distintos aislados clínicos. Carril 18: Perfil de restricción de la cepa de *M. tuberculosis* ATCC 25177. Carril 19: Control negativo con ADN genómico sin digerir ni ligar. Carril 20: Control negativo sin ADN.

El análisis de los electroferogramas obtenidos de los aislados clínicos de España permitió definir siete patrones (P1 a P7) (Figura 26), de los cuales los más prevalentes fueron los patrones P1 y P2 con 35 (55,6%) y 17(26,9%) aislados respectivamente, lo que suponía el 82,5% del total de los mismos. Le siguieron en frecuencia los patrones P3, P4 y P5 con 3 aislados cada uno (4,8%) y finalmente los patrones P6 y P7 con 1 aislado cada uno englobando el 1,59% (Figura 27). La cepa control *M. tuberculosis* ATCC 25177, mostró un perfil de restricción que no permitió su inclusión en ninguno de los patrones descritos para los aislados clínicos que fueron objeto de estudio (Figura 25).

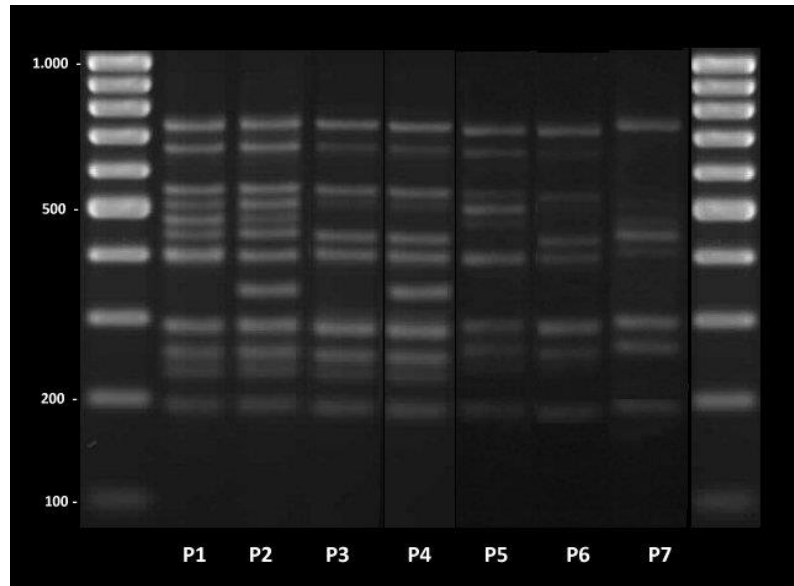


Figura 26. Diferentes patrones obtenidos con el *primer* XP-G

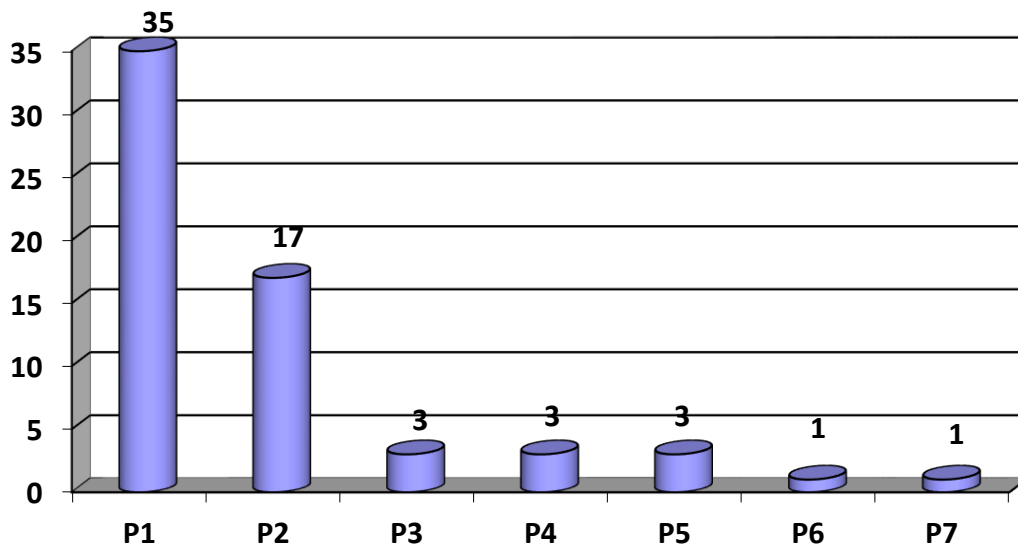


Figura 27. Distribución de las cepas de *M. tuberculosis* complex aisladas en España en los patrones AFLP

El cálculo del coeficiente de Dice demostró que el grado de similitud entre los aislados incluidos en los diferentes patrones de restricción variaba entre el 71% (P5 vs.

P7) y el 96% (P1 vs. P2) (P2 vs. P4) (Tabla 6) y permitió la obtención del dendograma de homología representado en la Figura 28.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
P1	1.00						
P2	0.96	1.00					
P3	0.95	0.91	1.00				
P4	0.91	0.96	0.95	1.00			
P5	0.95	0.91	0.90	0.86	1.00		
P6	0.80	0.86	0.84	0.90	0.74	1.00	
P7	0.78	0.74	0.82	0.78	0.71	0.75	1.00

Tabla 6. Matriz de similitud de los patrones de restricción obtenidos con el primer XP-G

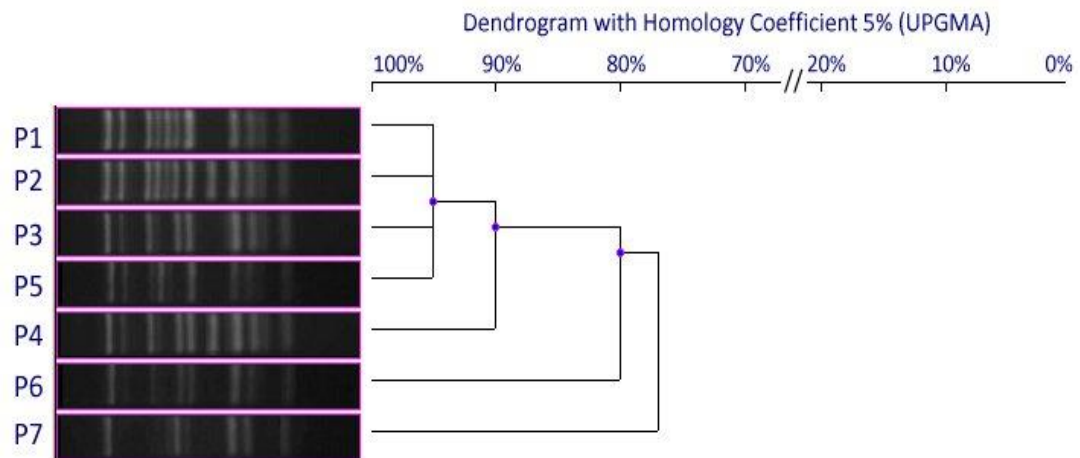


Figura 28. Dendograma de homología resumido obtenido con el primer XP-G

Todos los aislados identificados como *M. africanum* se incluyeron en el patrón P1, las dos cepas identificadas como *M. bovis* ssp. BCG en el patrón P5 y los aislados identificados como *M. tuberculosis* se distribuyeron en todos los patrones.

La distribución temporal de los *clusters* permitió constatar que los aislados incluidos en el más prevalente, el *cluster* P1, se distribuían a lo largo del periodo de estudio correspondiente a los años 2008, 2009, 2010 y 2011, y que en el año 2009 fue en el que se obtuvo un mayor número de *clusters* (6/7).

La distribución geográfica de los diferentes *clusters* mostró que el más prevalente, el patrón P1, fue hallado en todas las áreas (Manises, Hospital General Universitario de Valencia y Centro Penitenciario de Picassent), no encontrándose los patrones P3, P4, P5, P6 ni P7 en el Centro Penitenciario.

De los seis pacientes que aportaron varias muestras al ensayo, en cinco los patrones obtenidos en las diferentes muestras eran idénticos para cada paciente. En uno, las dos muestras estudiadas presentaron dos patrones diferentes (P1, P6).

Para el caso de las cepas aisladas en Ecuador, el análisis de los electroferogramas obtenidos permitió definir nueve patrones (P1, P2, P5, P6, P8, P10, P12, P13 y P14) (Figura 23 y 25), de los cuales los más prevalentes fueron los patrones P1 y P2 con 42 (66,7%) y 10 (15,9%) aislados respectivamente, lo que suponía el 82,6% del total de los mismos. Le siguieron en frecuencia los patrones P5, P6, P8 y P12 con 2 aislados cada uno (3,2%) y finalmente los patrones, P10, P13 y P14 con 1 aislado cada uno (1,6%) (Figura 29). La cepa control *M. tuberculosis* ATCC 25177, mostró un perfil de restricción que no permitió su inclusión en ninguno de los patrones descritos para los aislados clínicos que fueron objeto de estudio.

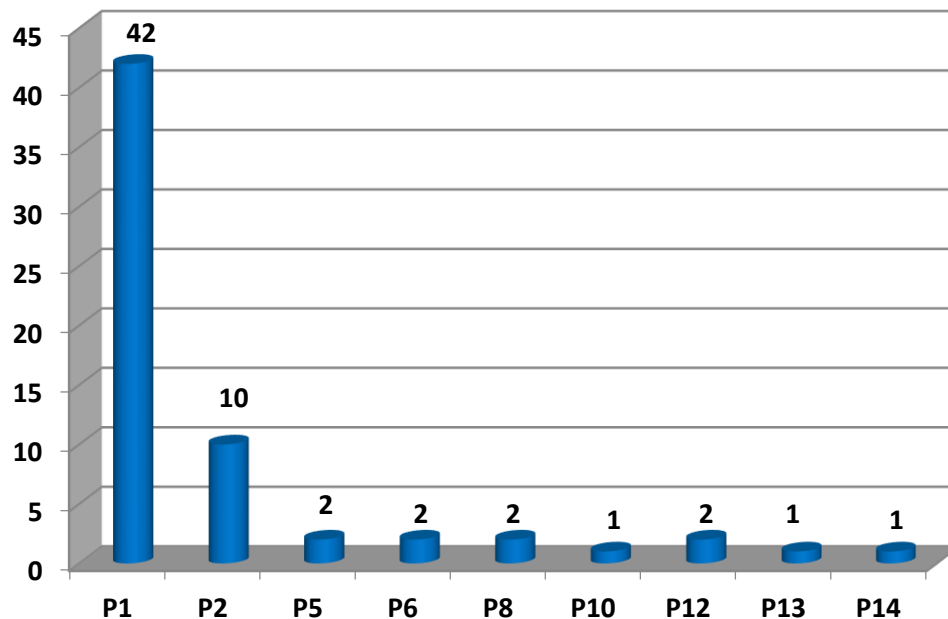


Figura 29. Distribución de patrones AFLP obtenidos de las cepas de *M. tuberculosis* complex aisladas en Ecuador

La aplicación del coeficiente de Dice demostró que el grado de similitud entre los aislados incluidos en los diferentes patrones de restricción variaba entre el 50% (P1 vs. P12) y el 96% (P1 vs. P2).

La distribución temporal de los clusters permitió constatar que los aislados incluidos en el *cluster* más prevalente (P1), se distribuían a lo largo del periodo de estudio correspondiente a los años 2006 a 2013 y que en el año 2012 se obtuvo un mayor número de *clusters* (5/9).

La distribución geográfica de los diferentes *clusters* mostró que el más prevalente, el patrón P1, fue hallado en todas las provincias involucradas en el estudio.

Existieron nueve pacientes con más de una muestra clínica: las diferentes muestras obtenidas de un mismo paciente presentaron patrones idénticos en ocho casos.

Tan sólo en un paciente del que se habían obtenido tres muestras, se pudieron describir dos patrones distintos (P12 y P13).

Al realizar un estudio en conjunto de los electroferogramas obtenidos entre los aislados de España y Ecuador, se puede observar la presencia de doce patrones (P1 a P8, P10, P12, P13, P14), de los cuales los más prevalentes fueron los patrones P1 y P2 con 77 (61,1%) y 27 (21,4%) aislados respectivamente, lo que supone el 82,5% del total de los mismos. Le siguieron en frecuencia el patrón P5 con 5 (3,9%) aislados, los patrones P3, P4 y P6 agruparon a 3 aislados cada uno (2,4%), los patrones P8 y P12 con 2 aislados (1,6%) y finalmente los patrones P7, P10, P13 y P14 con 1 aislado cada uno (0,8%)(Figura 30). La cepa control *M. tuberculosis* ATCC 25177, mostró un perfil de restricción que no permitió su inclusión en ninguno de los patrones descritos.

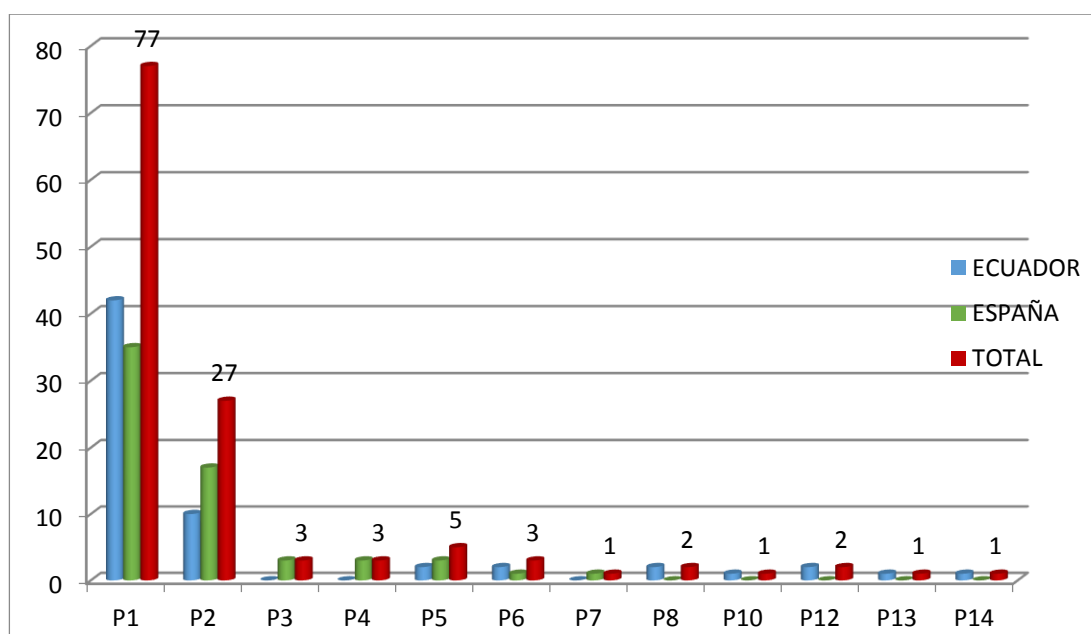


Figura 30: Distribución de patrones de restricción por cepa y por origen (Ecuador y España).

Tanto para España como para el caso de Ecuador, la distribución temporal de los *clusters* permitió constatar que los aislados incluidos en el *cluster* más prevalente (P1), se

distribuían a lo largo del periodo de estudio y que tuvo gran representatividad en todas las áreas geográficas involucradas en el estudio.

El poder discriminatorio de este ensayo AFLP con la enzima de restricción *Xho*I, fue calculado mediante el índice discriminatorio de Hunter Ganston (HGDI), obteniéndose un valor de 0,5812.

4.5.2 MIRU-VNTR

Se analizaron 15 loci MIRU- VNTRs en 126 aislados clínicos. La amplificación de cada locus se realizó mediante PCR individuales como se describe en el apartado de metodología del presente trabajo y la visualización de los fragmentos amplificados se observó mediante geles de agarosa al 1,5%. Las PCRs se estandarizaron con dos cepas control H37Ra y H37Rv (Figura 31) lo que permitió obtener el mirutipo de cada una de ellas (Tabla 7), para luego analizar los 15 MIRU- VNTRs para cada uno de los aislados clínicos en estudio.



Figura 31. Mirutipo para cepas control H37Ra y H37Rv

CEPA	MIRU 4	MIRU 26	MIRU 40	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 31	MIRU 42	MIRU 43	MIRU ETR A	MIRU 47	MIRU 52	MIRU 53	MIRU QUB-1 1b	MIRU 1955	MIRU QUB-26
H37Ra 25177	3'	3	1	3	2	3	2	4	3	2	5	2	5	2	5
H37 Rv	3'	3	1	3	2	3	2	4	3	2	4	2	5	2	5

Tabla 7. Mirutipo 15 loci de las cepas control H37Rv y H37Ra

En las Figuras 32 a la 46 se observan las imágenes de la electroforesis en agarosa para cada uno de los 15 loci MIRU-VNTR analizados para los 63 aislados clínicos ecuatorianos y 63 aislados clínicos españoles, en donde se puede observar la banda de la cepa control que nos sirve de referencia para hacer la asignación alélica de las muestras analizadas.

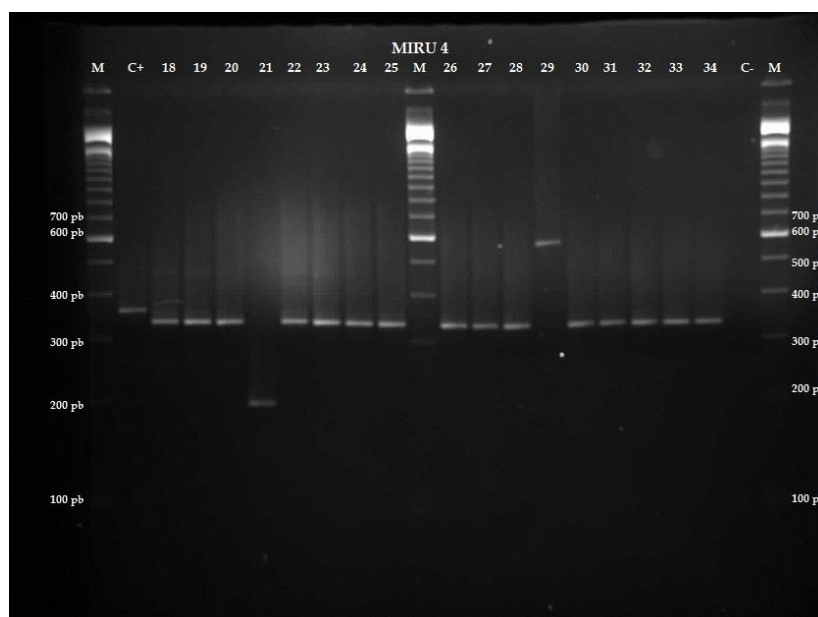


Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU 4: Carril 1, 11 y 22 marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2 control positivo. Carril 21 control negativo. Carriles 3-9 y 12-20 aislados clínicos analizados.

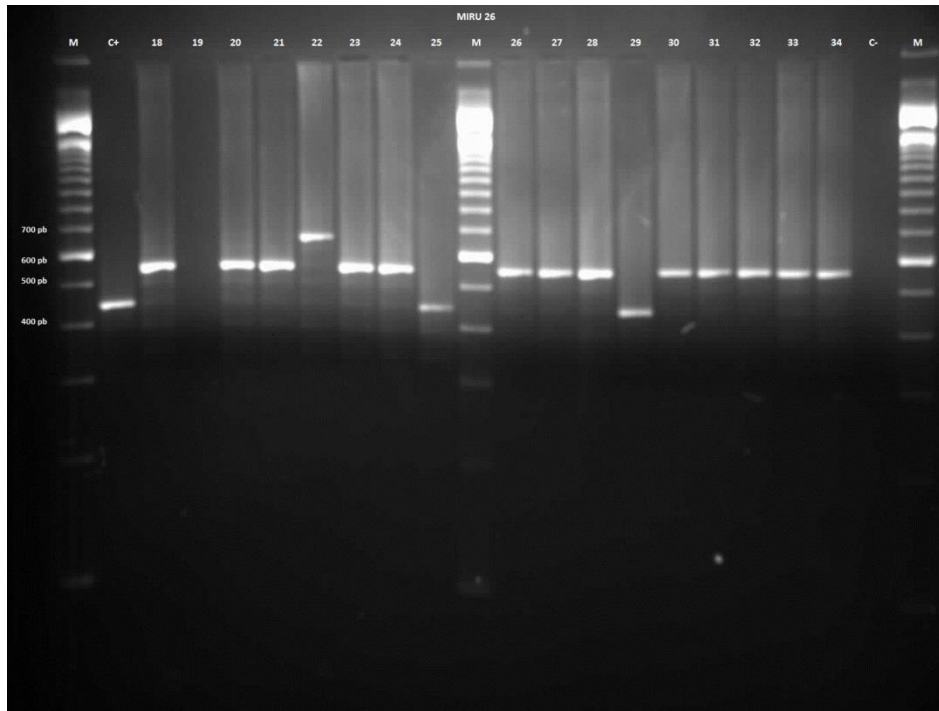


Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU 26: Carril 1, 11 y 22 marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2 control positivo. Carril 21 control negativo. Carriles 3-9 y 12-20 aislados clínicos analizados.

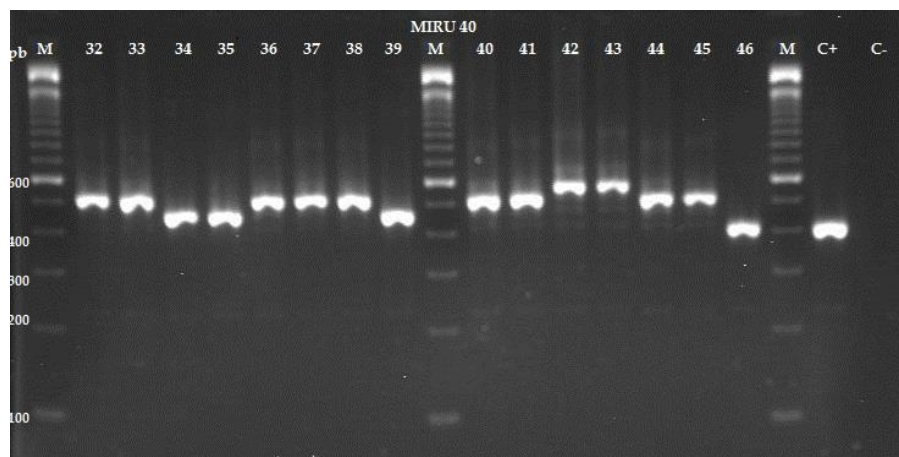


Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU 40: Carril 1, 10 y 18 marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 19 control positivo. Carril 20 control negativo. Carriles 2-9 y 11-17 aislados clínicos analizados.

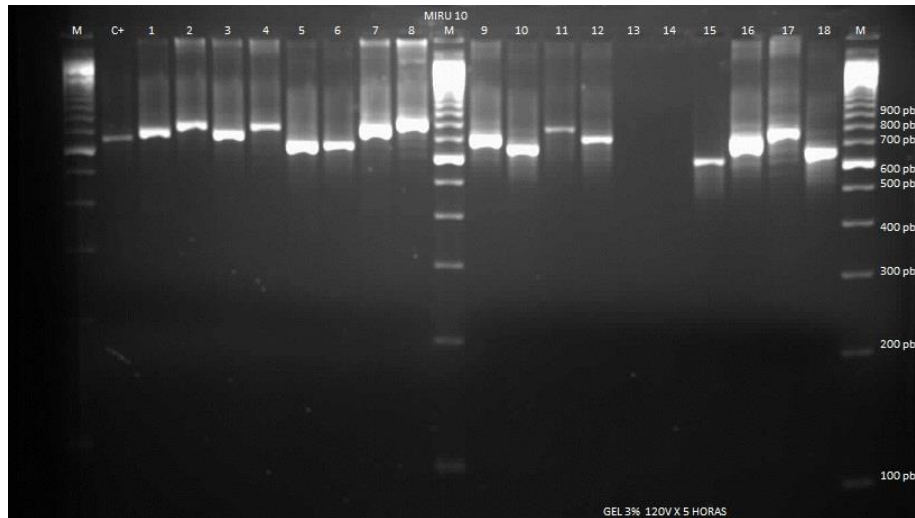


Figura 35. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU 10: Carril 1, 11 y 22 marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2 control positivo. Carriles 3-10 y 12-21 aislados clínicos analizados.

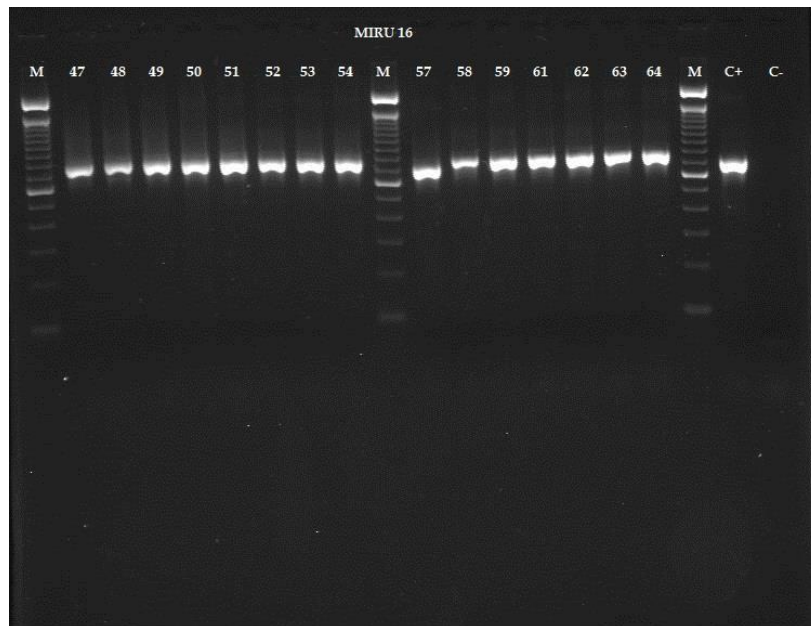


Figura 36. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU 16: Carril 1, 10 y 18 marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 19 control positivo. Carril 20 control negativo. Carriles 2-9 y 11-17 aislados clínicos analizados.

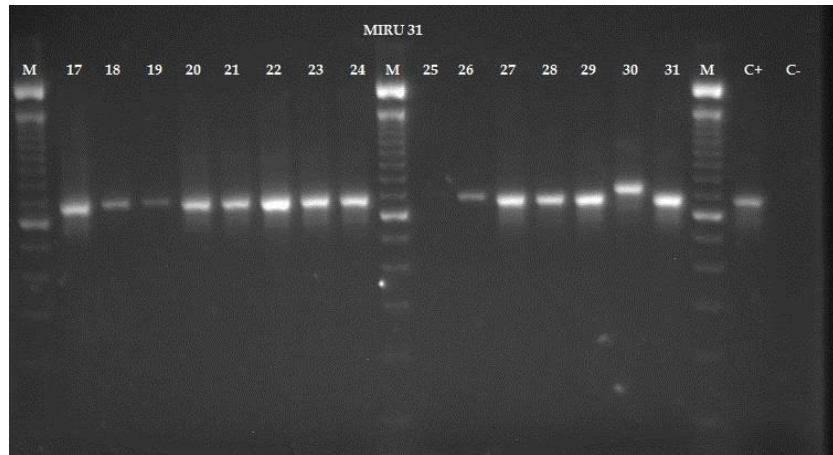


Figura 37. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU 31: Carril 1, 10 y 18 marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 19 control positivo. Carril 20 control negativo. Carriles 2-9 y 11-17 aislados clínicos analizados.

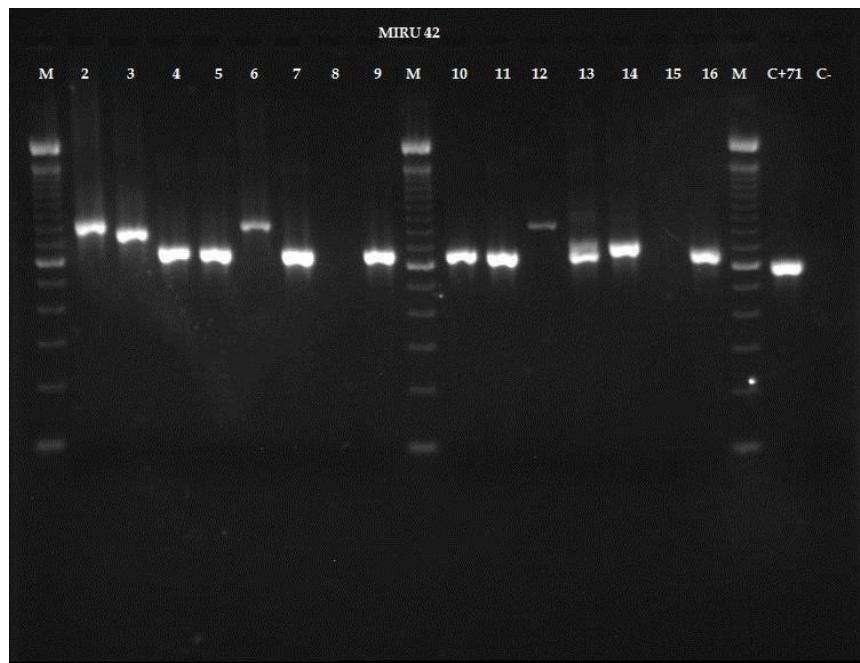


Figura 38. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU 42: Carril 1, 10 y 18 marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 19 control positivo. Carril 20 control negativo. Carriles 2-9 y 11-17 aislados clínicos analizados.

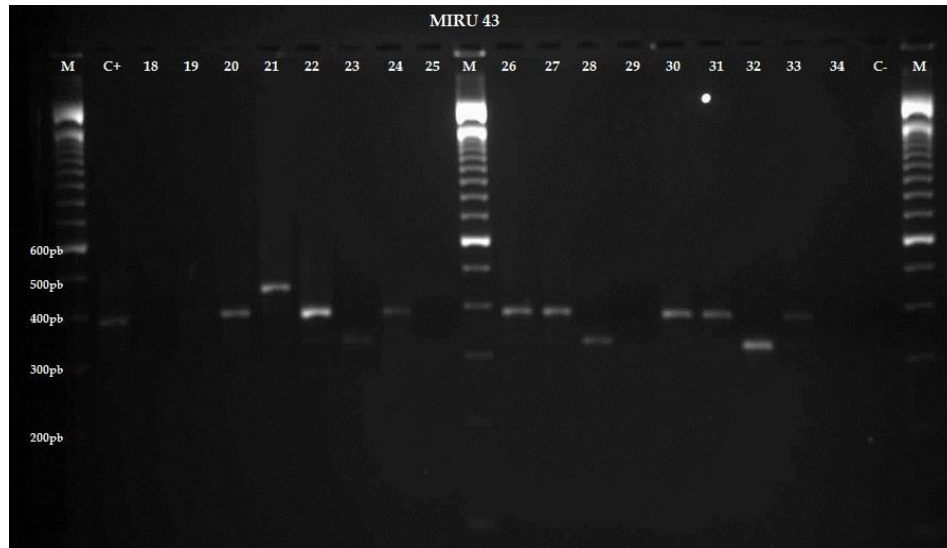


Figura 39. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU 43: Carril 1, 11 y 22 marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2 control positivo. Carril 21 control negativo. Carriles 3-10 y 12-20 aislados clínicos analizados.

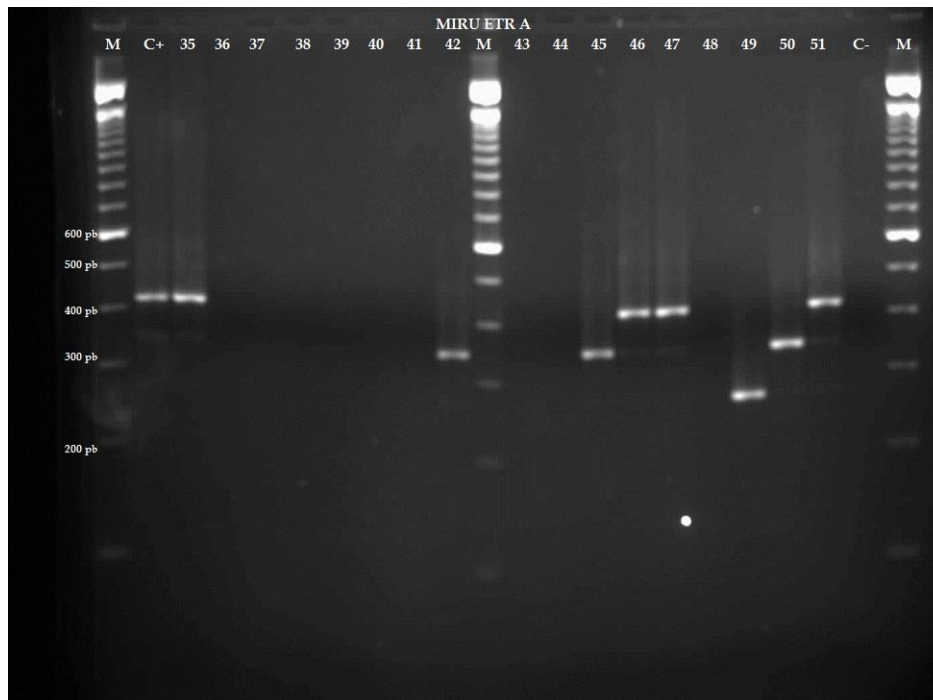


Figura 40. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU ETR A: Carril 1, 11 y 22 marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2 control positivo. Carril 21 control negativo. Carriles 3-10 y 12-20 aislados clínicos analizados.

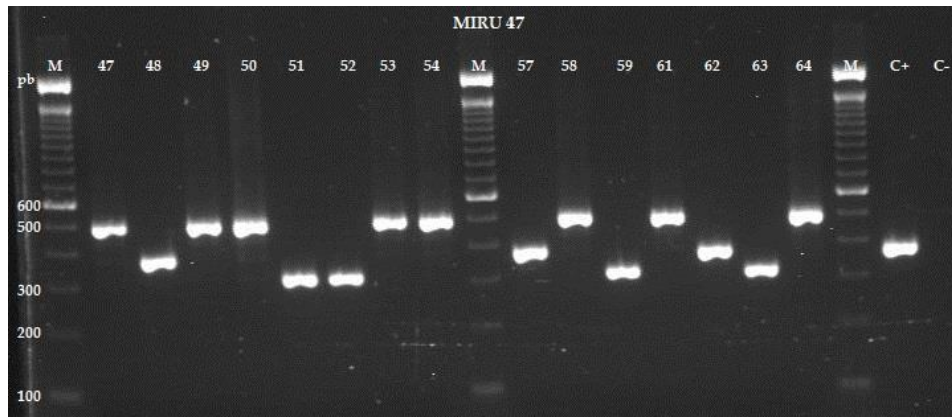


Figura 41. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU 47: Carril 1, 10 y 18 marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 19 control positivo. Carril 20 control negativo. Carriles 2-9 y 11-17 aislados clínicos analizados.

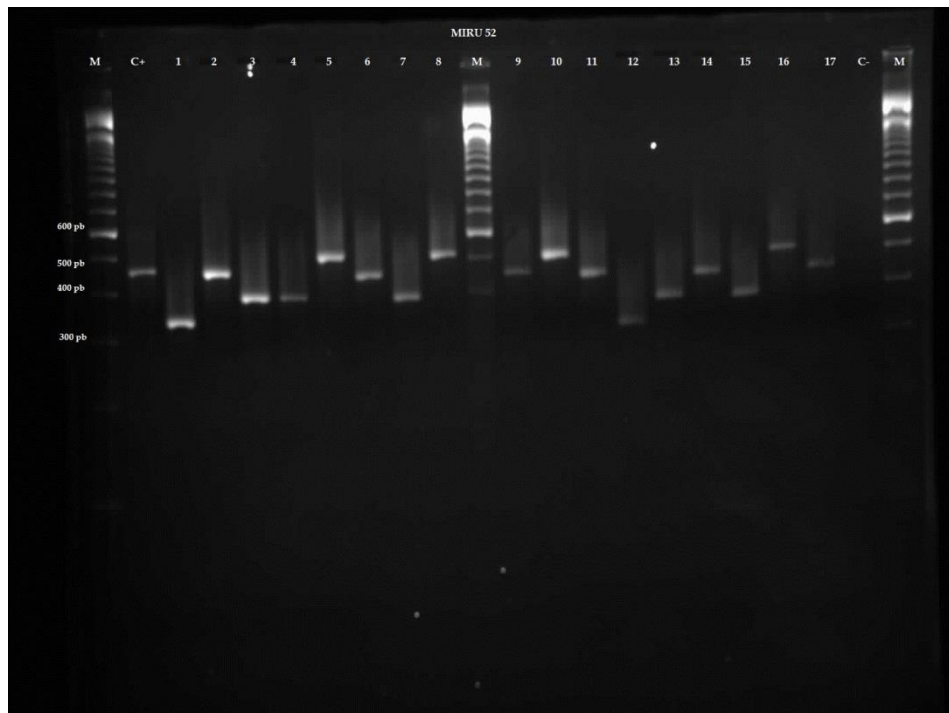


Figura 42. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU 52: Carril 1, 11 y 22 marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2 control positivo. Carril 21 control negativo. Carriles 3-10 y 12-20 aislados clínicos analizados.

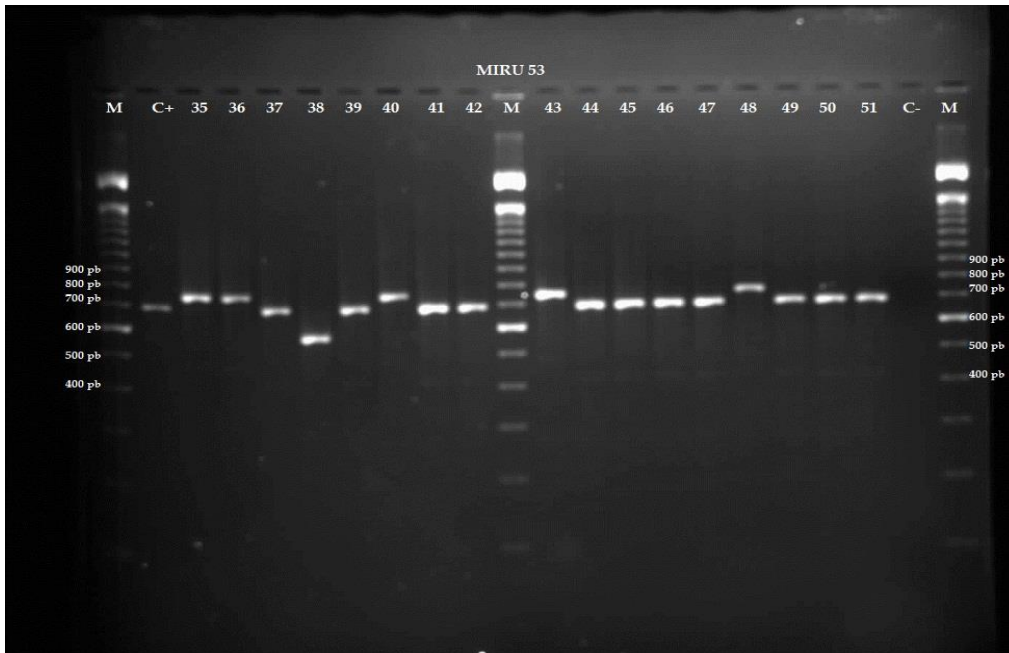


Figura 43. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU 53: Carril 1, 11 y 22 marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2 control positivo. Carril 21 control negativo. Carriles 3-10 y 12-20 aislados clínicos analizados.

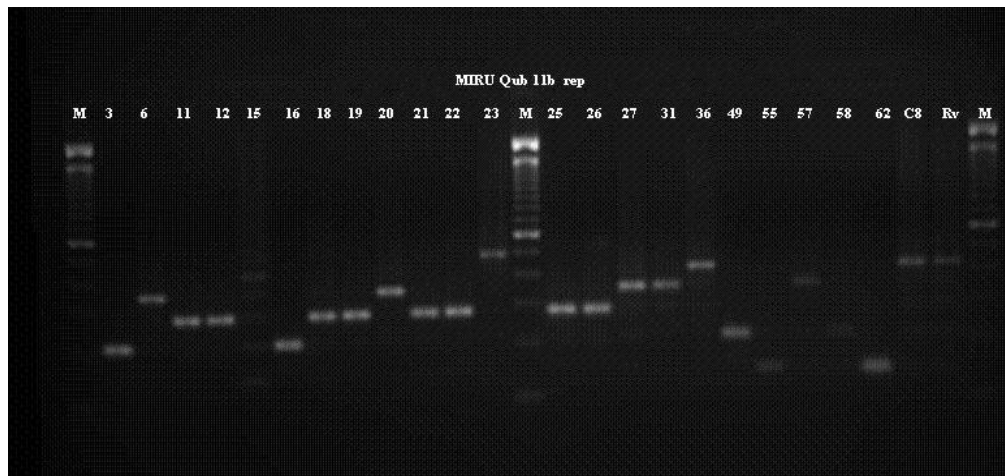


Figura 44. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU Qub1 1b: Carril 1, 14 y 27 marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 26 control positivo. Carriles 2-13 y 15-25 aislados clínicos analizados.

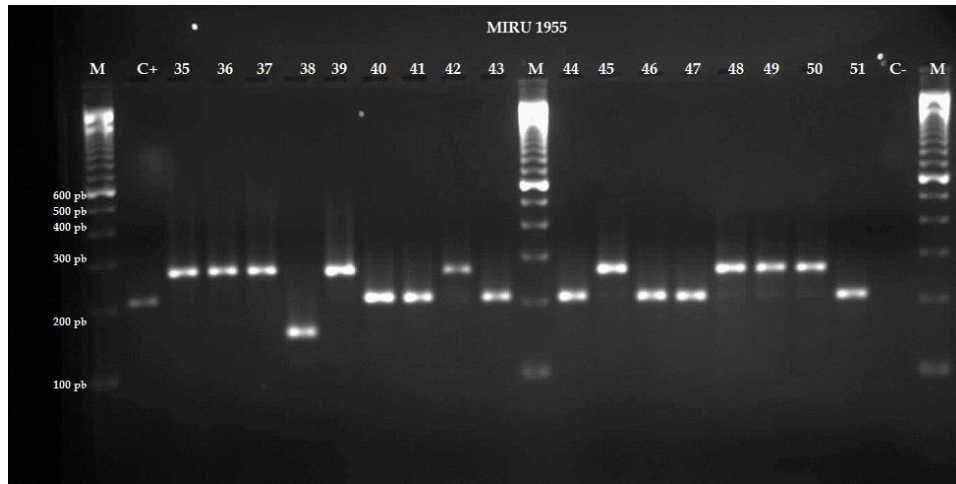


Figura 45. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU 1955: Carril 1, 12 y 22 marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2 control positivo. Carril 21 control negativo. Carriles 3-11 y 13-20 aislados clínicos analizados.

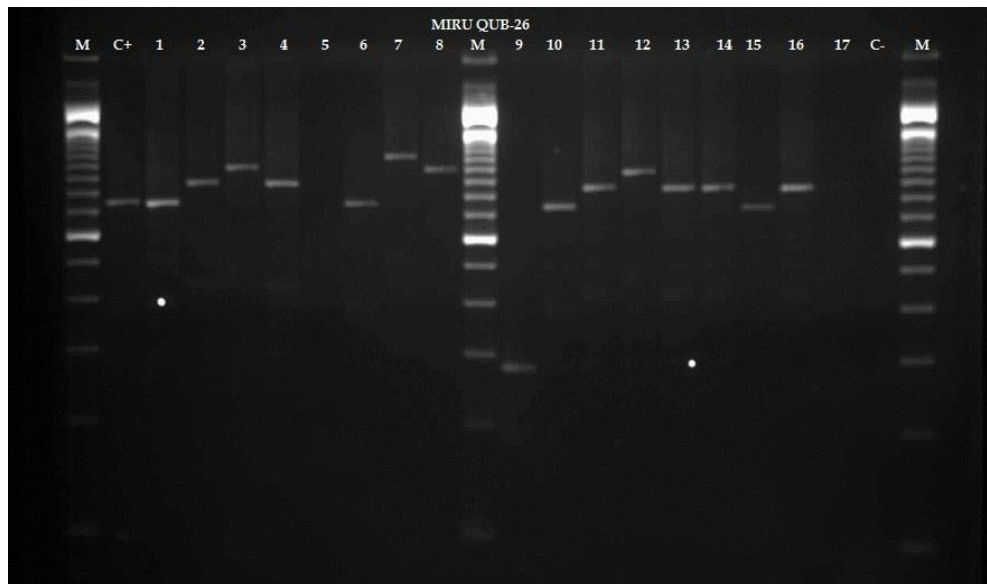


Figura 46. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para MIRU QUB-26: Carril 1, 11 y 22 marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2 control positivo. Carril 21 control negativo. Carriles 3-10 y 12-20 aislados clínicos analizados.

Una vez realizada la asignación alélica para cada aislado clínico, se obtuvo el mirutipo formado por 15 dígitos que se muestran en las Figuras 47 y 51 para los aislados clínicos provenientes de Ecuador y España respectivamente, además podemos observar

los patrones de resistencia y el dendograma de homología entre las cepas estudiadas (Figura 47).

Para el caso de las cepas analizadas en Ecuador, podemos apreciar en la Figura 47, que existen cepas con idéntico mirutipo, de las cuales las cepas asignadas con los números 2 y 6 provienen del mismo paciente, al igual que las cepas 51-52, 23-24, 53-54. La cepa 5 presenta un mirutipo idéntico a las cepas 22 y 25: aunque la primera corresponde a un paciente distinto, pero las tres cepas se aislaron en la provincia de Sucumbíos. Además, es preciso mencionar que el patrón de sensibilidad a fármacos de las cepas 22 y 25 corresponde a multidrogo-rresistente (TB-MDR). Las cepas 10-11 con igual mirutipo corresponden a dos pacientes distintos, pero ambos originarios del cantón Pangua y que fueron aislados en los años 2009 y 2010, respectivamente. Las cepas 37-38 pese a tener el mismo mirutipo, corresponden a pacientes distintos, al igual que las cepas 40-45, pero en este caso ambos pacientes son originarios de la provincia de Pichincha.

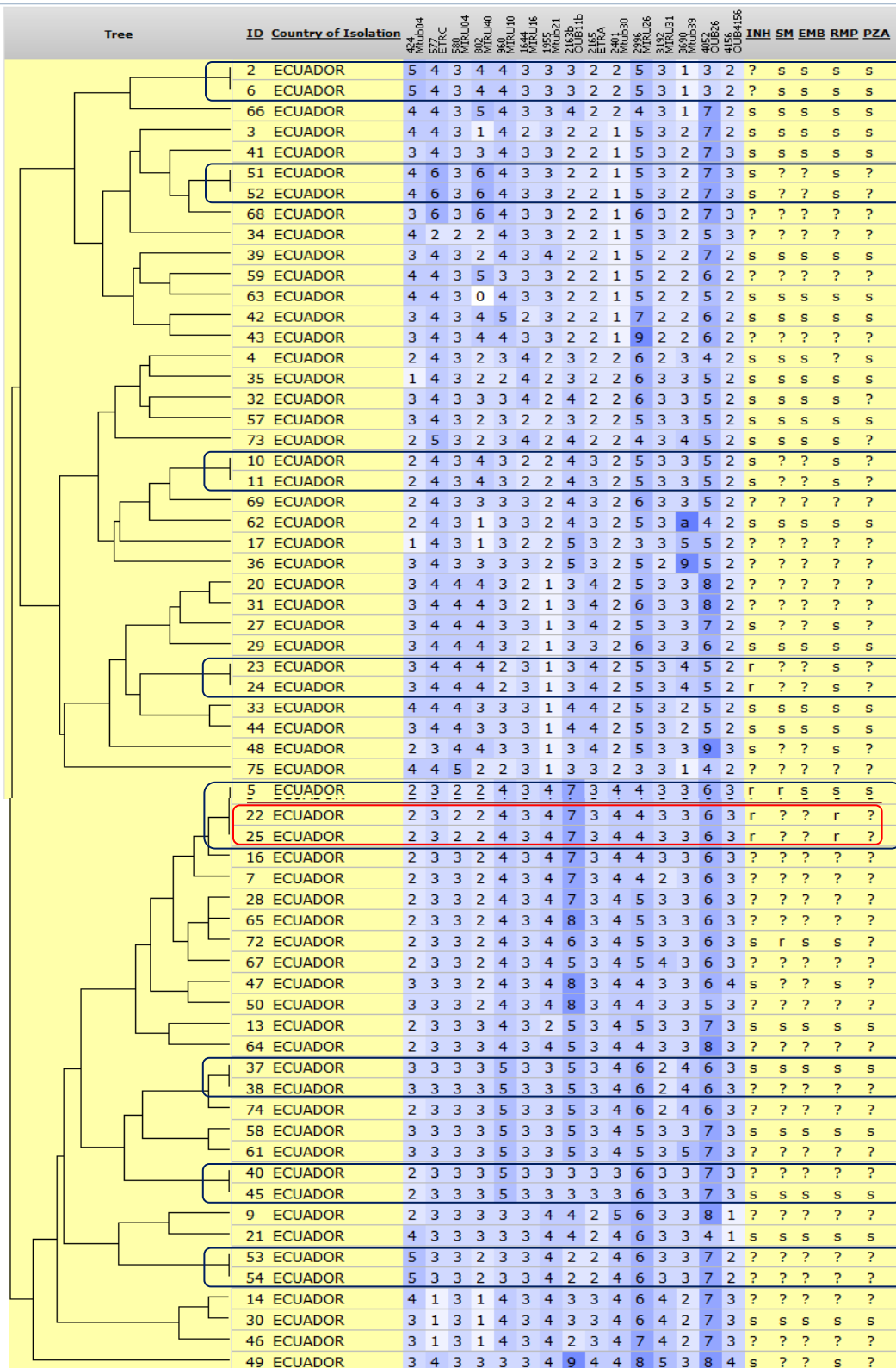


Figura 47. Dendrograma UPGMA, mirutipo basado en 15 loci MIRU-VNTR y patrones de sensibilidad de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de Ecuador.

En relación a la variabilidad de los 15 *loci* analizados podemos observar en la Figura 47 la diferente tonalidad en las celdas azules según el número de copias de cada miru, en donde el aumento de la intensidad de la coloración está relacionada directamente con la presencia de un mayor número de copias. Por lo tanto, los *loci* con menor variabilidad son 16(0,34), 4(0,36) y 31(0,40), a diferencia de los *loci* QUB11b(0,81), QUB 26(0,67), 40(0,76) y 1955(0,72) que presentan mayor polimorfismo. El cálculo de la diversidad alélica para cada locus fue realizada mediante la plataforma virtual www.miruvntrplus.org y sus valores se muestran en la Figura 48.

Statistics For <i>Browse Database Table</i>					
Strain Count					
Number of user strains: 63					
Number of reference strains: 0					
Clustering Rate					
Clustering rate MIRU-VNTR: 0.14285715					
Clustering rate Spoligo: NaN					
Allelic Diversity					
424	802	1955	2401	3690	
Mtub04 : 0.69	MIRU40 : 0.76	Mtub21 : 0.72	Mtub30 : 0.66	Mtub39 : 0.64	
577	960	2163b	2996	4052	
ETRC : 0.6	MIRU10 : 0.64	QUB11b : 0.81	MIRU26 : 0.67	QUB26 : 0.77	
580	1644	2165	3192	4156	
MIRU04 : 0.36	MIRU16 : 0.34	ETRA : 0.6	MIRU31 : 0.4	QUB4156 : 0.55	

Figura 48. Cálculo de la diversidad alélica para los 15 loci miru-vntr en aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* ecuatorianos.

Utilizando la plataforma virtual www.miruvntrplus.org se construyó un árbol de expansión mínima (Figura 49) considerando una variación máxima de hasta dos loci para formar los distintos complejos clonales (CC). Se observó 35 patrones únicos (55,6%) y 28 cepas (44,4%) agrupadas en 8 complejos clonales (Figura 50) formados por un mínimo de 2 cepas y un máximo de 9 cepas. El complejo clonal 1 está formado por 9 cepas, de las cuales dos son MDR-TB.

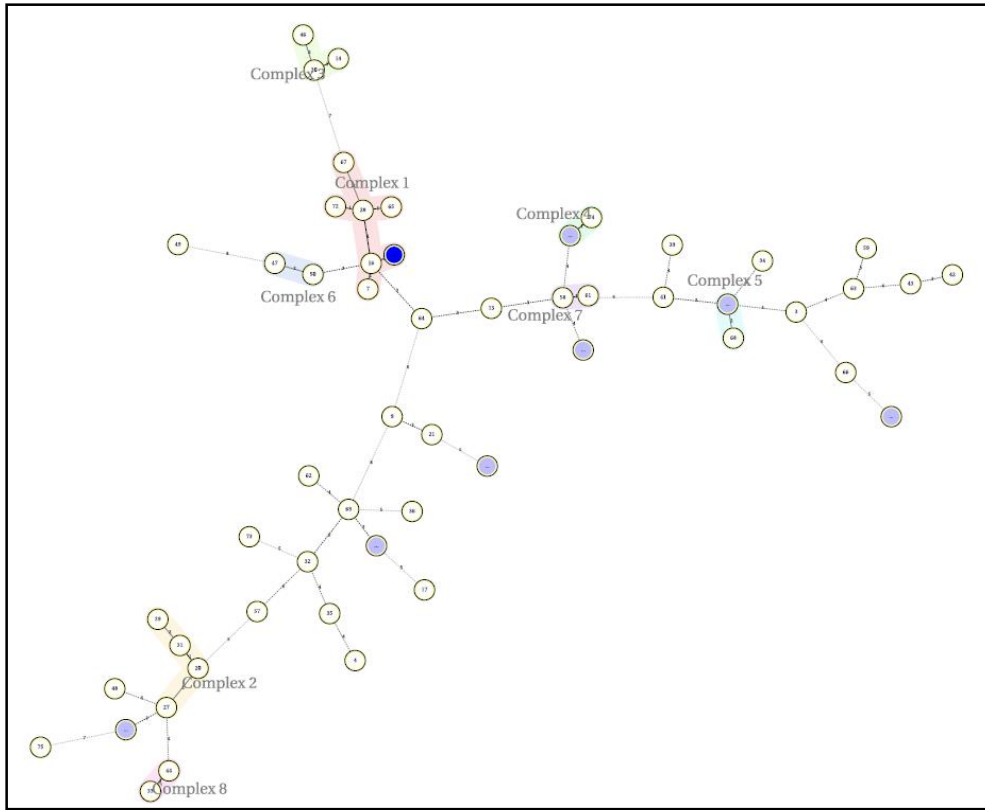


Figura 49: Arbol de mínima expansión construido a partir de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* ecuatorianos (la diferencia máxima entre complejos clonales es de 2 loci)(www.miru-vnrplus.org).

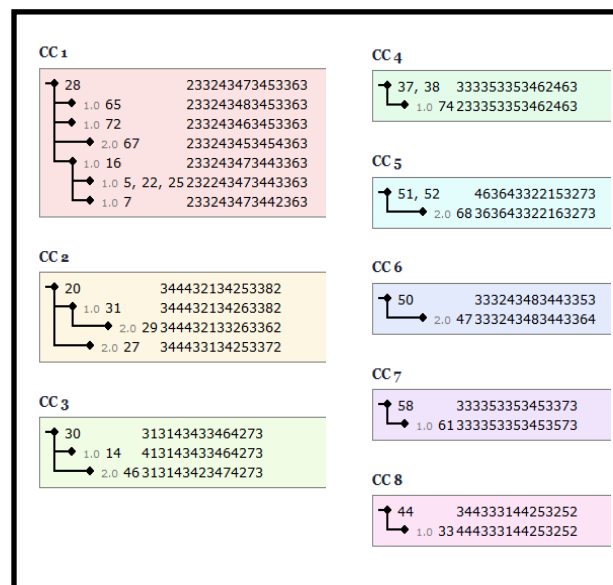


Figura 50: Distribución de los aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* ecuatorianos en ocho complejos clonales (www.miru-vnrplus.org).

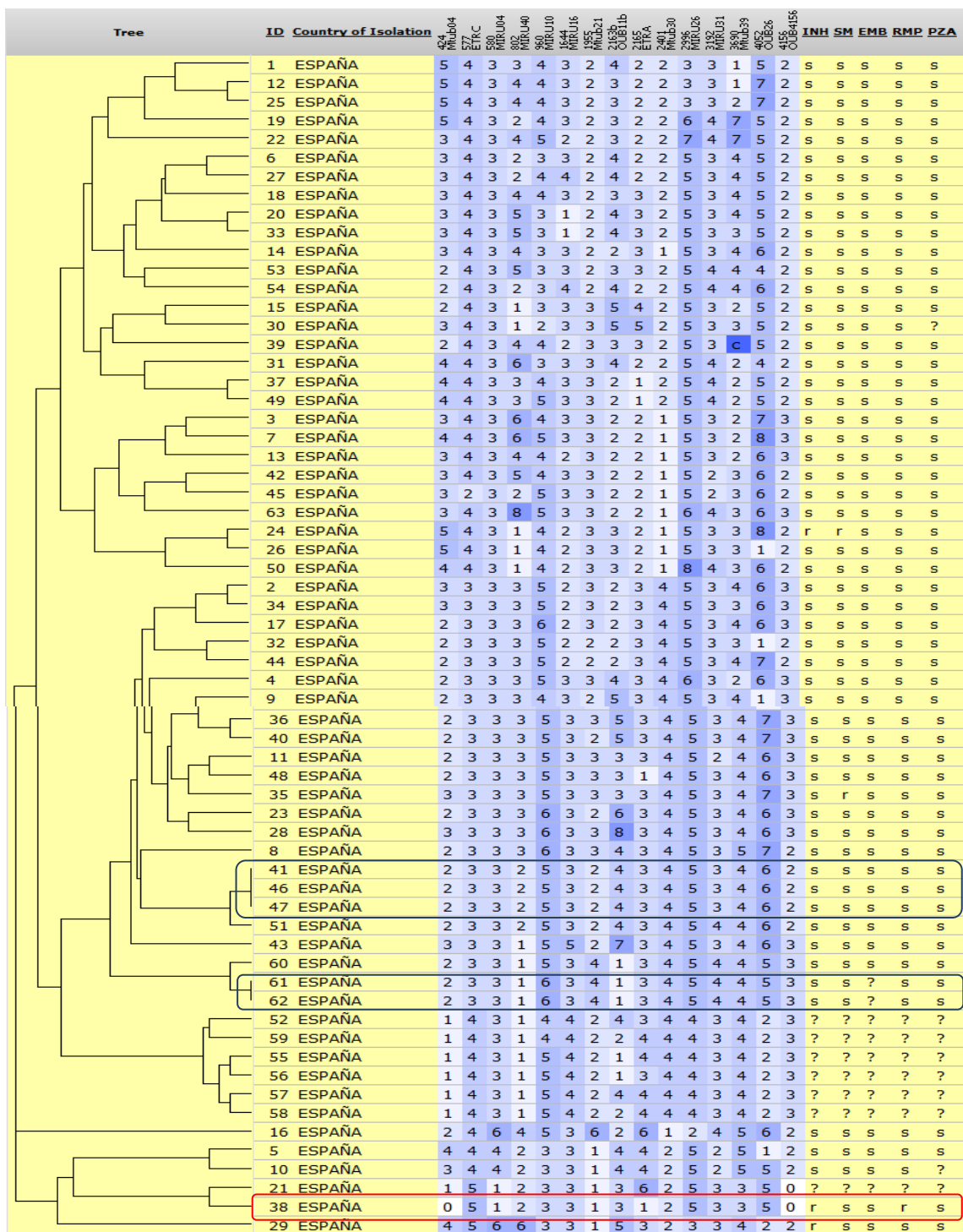


Figura 51: Dendrograma UPGMA, mirutipo basado en 15 loci MIRU-VNTR y patrones de sensibilidad de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de España (www.miru-vntrplus.org).

En el caso de los aislados clínicos españoles, podemos observar en la Figura 51, que las cepas 41, 46 y 47 tienen igual mirutipo, sin embargo corresponden a pacientes distintos, a diferencia de las cepas 61 y 62 que si pertenecen al mismo paciente. En relación al patrón de sensibilidad a fármacos, la única cepa con perfil TB-MDR corresponde a la identificada como 38.

En relación a la variabilidad de los 15 loci analizados podemos observar en la Figura 51 y 52 que los loci con menor variabilidad son 4(0,17), 26(0,42) y 31(0,45) a diferencia de los loci 40(0,79), QUB11b(0,78), QUB 26(0,76), y 42(0,74) que presentan mayor polimorfismo. El cálculo de la diversidad alélica para cada locus fue realizado mediante la plataforma virtual www.miruvnrplus.org y sus valores se muestran en la Figura 52.

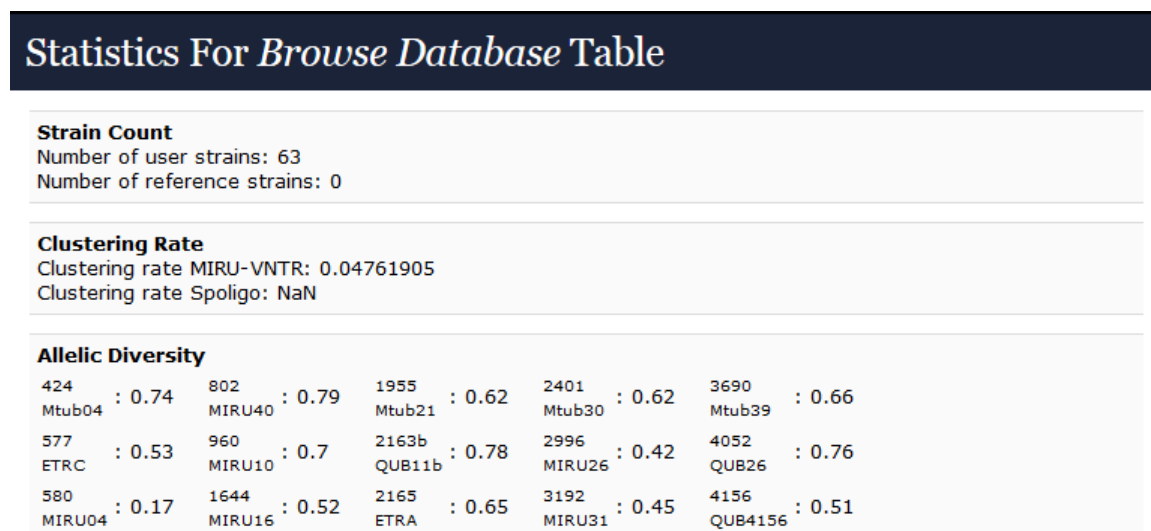


Figura 52. Cálculo de la diversidad alélica para los 15 loci miru-vntr en aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* españoles. (www.miruvnrplus.org)

La plataforma virtual www.miruvnrplus.org permitió construir un árbol de expansión mínima (Figura 53) considerando una variación máxima de hasta dos loci para formar los distintos complejos clonales (CC). Se observaron 25 patrones únicos (39,7%) y 38 cepas (60,3%) agrupadas en 14 complejos clonales (Figura 54) formados por un mínimo de 2 cepas y un máximo de 6 cepas. En el caso del CC12, está formado por 2 cepas de las cuales una es TB-MDR.

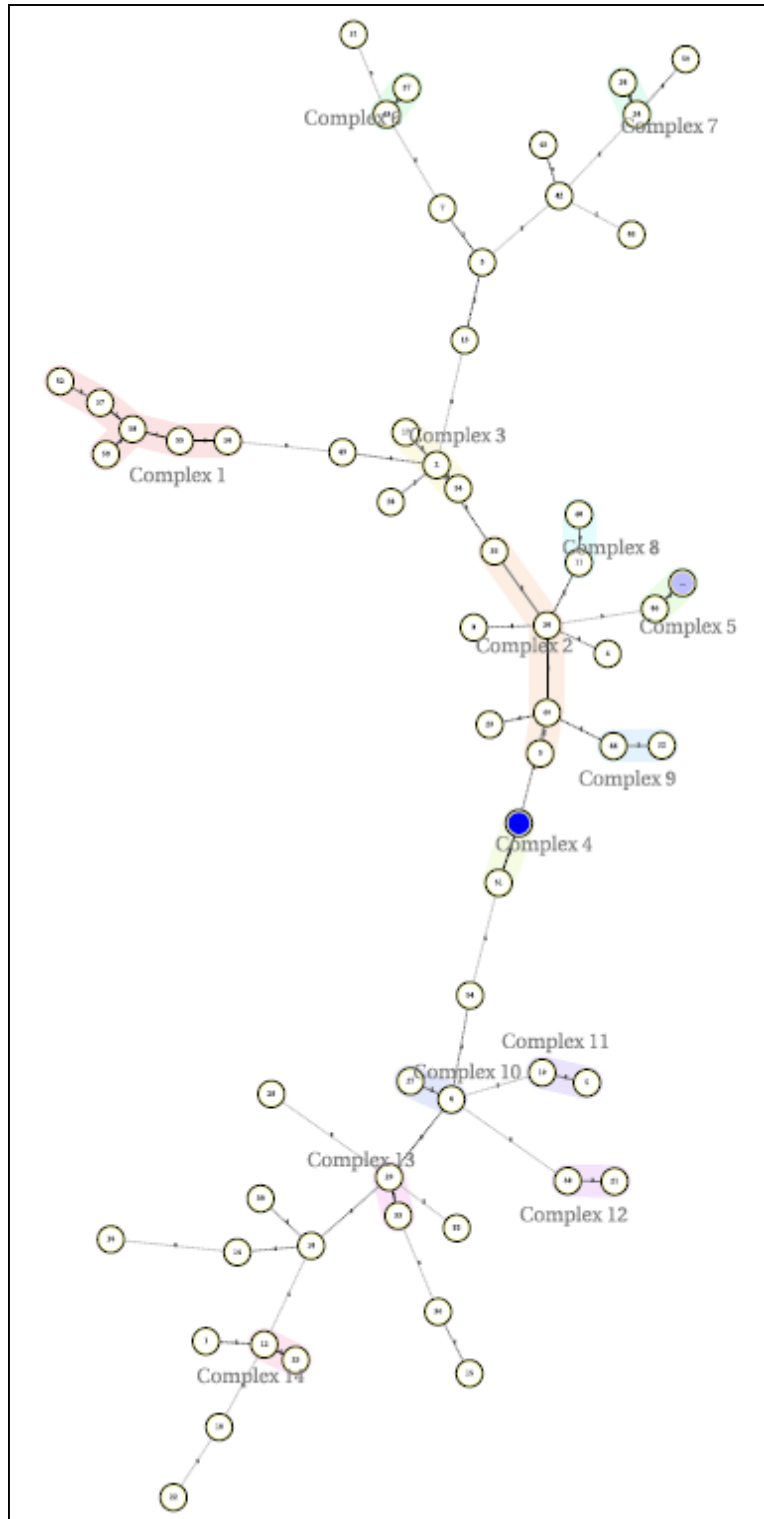


Figura 53: Arbol de mínima expansión construido a partir de aislados clínicos *Mycobacterium tuberculosis* españoles (la diferencia máxima entre complejos clonales es de 2 loci)(www.miru-vntrplus.org).

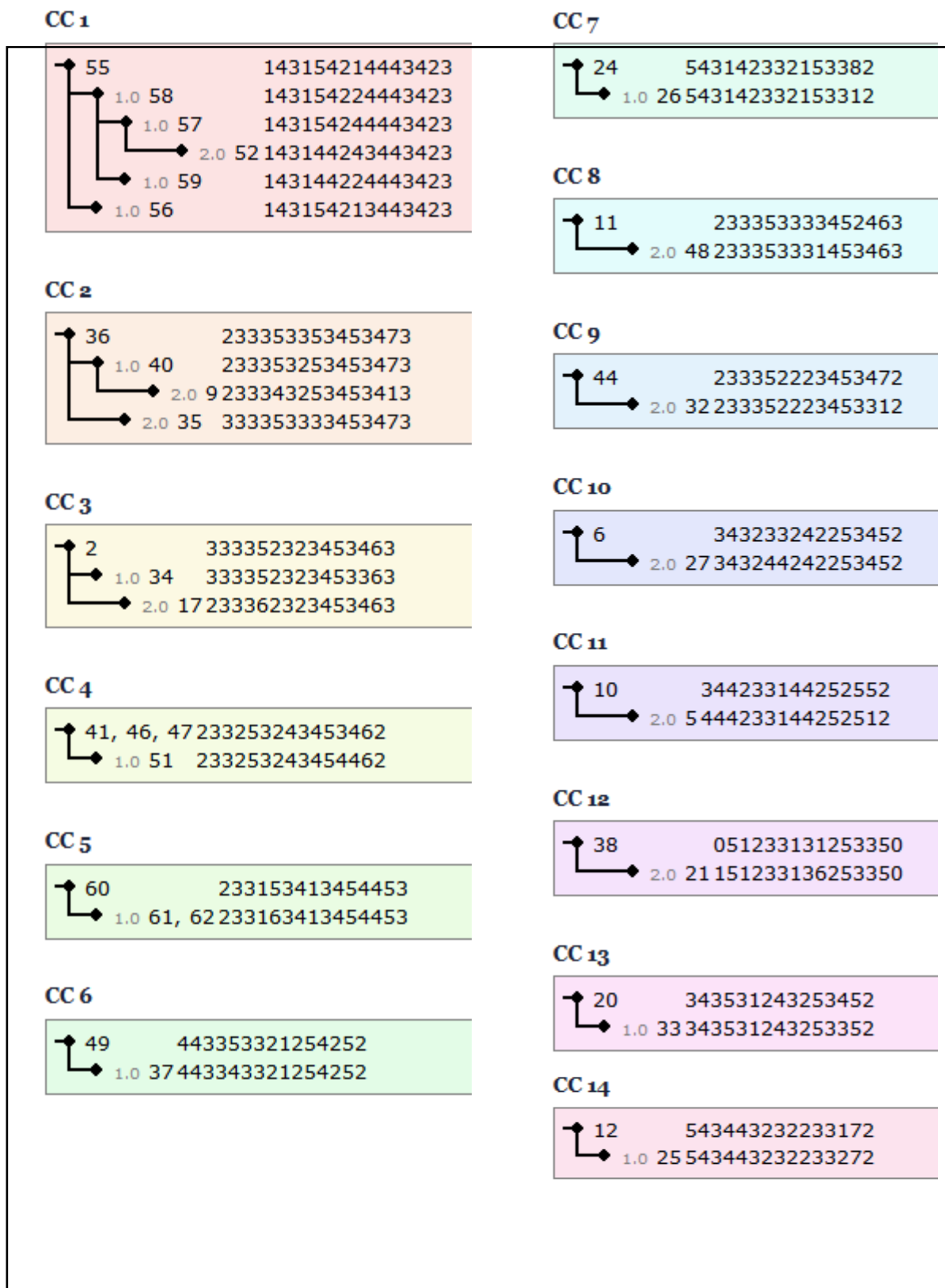


Figura 54: Distribución de los aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* españoles en ocho complejos clonales (www.miru-vntrplus.org).

Al analizar en conjunto los mirutipos de las cepas de Ecuador y España se observa (Figuras 55,56 y 57) que los *loci* con mayor número de alelos son QUB11b (8 alelos), Qub 26 (7 alelos) y 40 (7 alelos) lo cual implica un elevado polimorfismo, a diferencia de los *loci* 4,16 y 31 que presentaron 4, 5 y 4 alelos respectivamente.

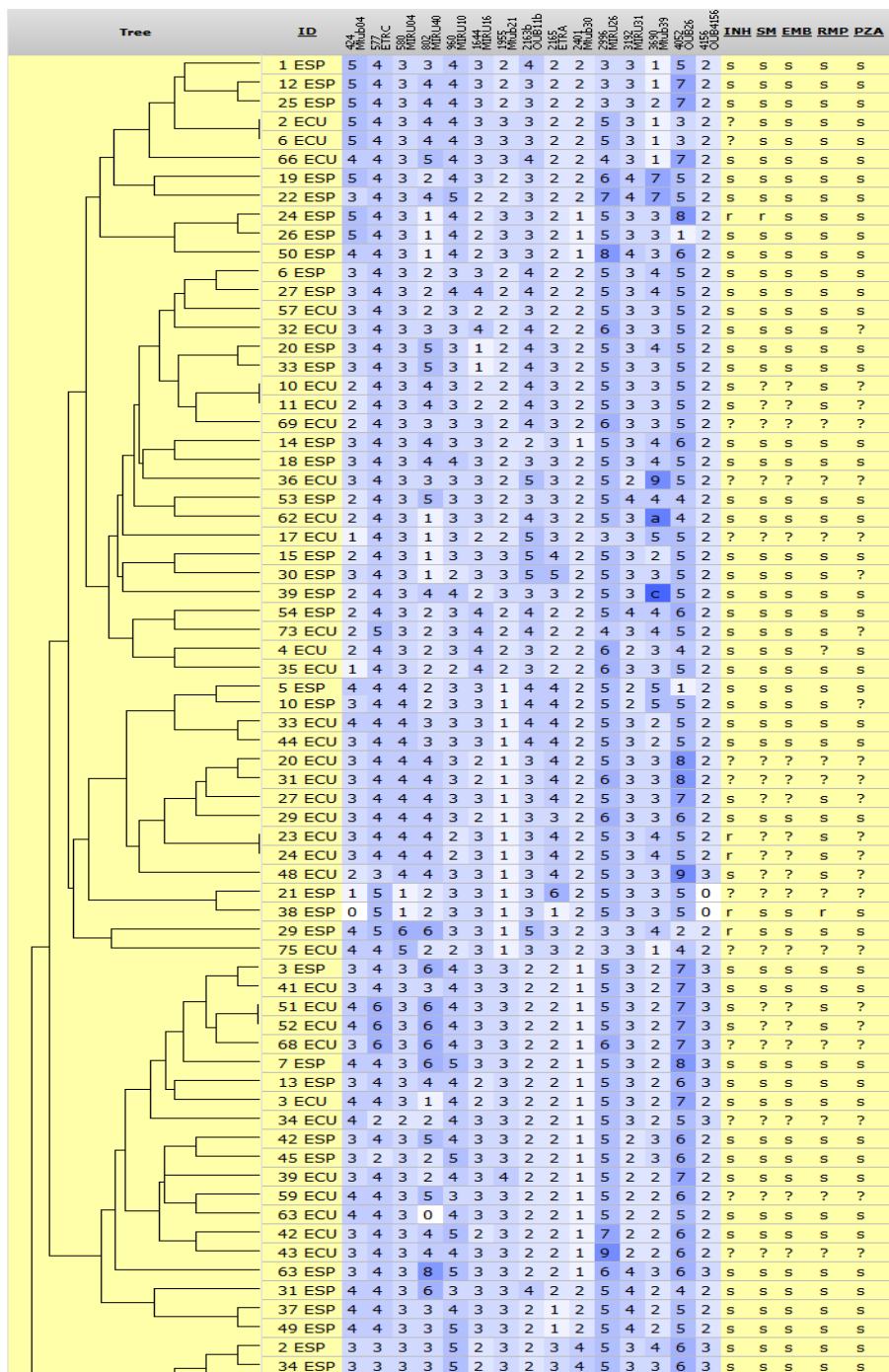


Figura 55: Dendrograma UPGMA, mirutipo basado en 15 loci MIRU-VNTR y patrones de sensibilidad de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de España y Ecuador.(parte 1) (www.miru-vnrplus.org).

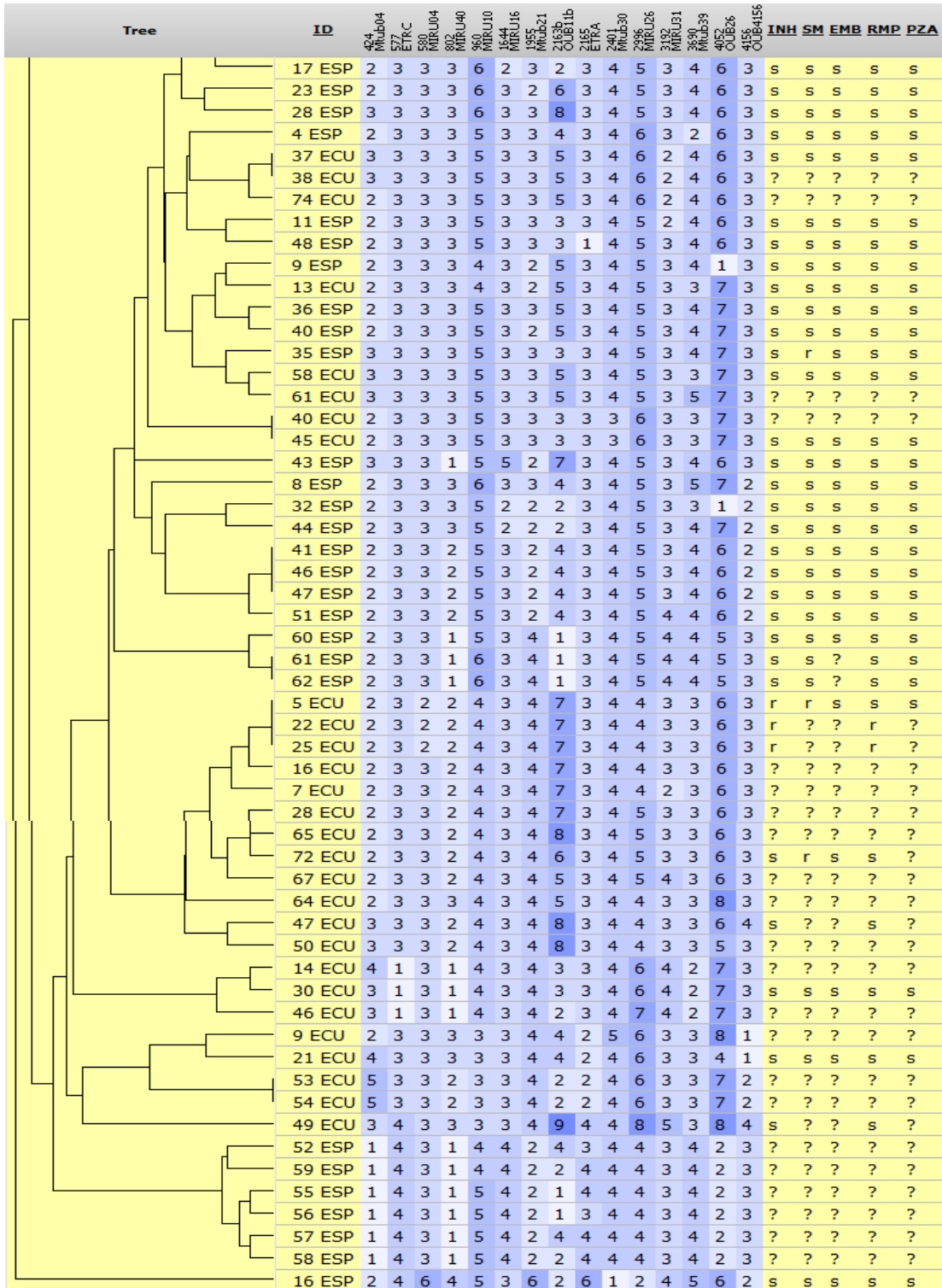


Figura 56: Dendrograma UPGMA, mirutipo basado en 15 loci MIRU-VNTR y patrones de sensibilidad de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de España y Ecuador.(parte 2).

Statistics For *Browse Database Table*

Strain Count

Number of user strains: 126

Number of reference strains: 0

Clustering Rate

Clustering rate MIRU-VNTR: 0.0952381

Clustering rate Spoligo: NaN

Allelic Diversity

424 Mtub04	: 0.72	802 MIRU40	: 0.79	1955 Mtub21	: 0.71	2401 Mtub30	: 0.64	3690 Mtub39	: 0.73
577 ETRC	: 0.57	960 MIRU10	: 0.71	2163b QUB11b	: 0.8	2996 MIRU26	: 0.59	4052 QUB26	: 0.78
580 MIRU04	: 0.28	1644 MIRU16	: 0.44	2165 ETRA	: 0.63	3192 MIRU31	: 0.44	4156 QUB4156	: 0.54

Figura 57. Cálculo de la diversidad alélica para los 15 *loci* miru-vntr en aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* españoles y ecuatorianos. (www.miru-vntrplus.org).

Mediante la plataforma virtual www.miruvntrplus.org se construyó el árbol de distancias mínimas (Figura 58.) considerando una variación máxima de hasta dos loci para formar los distintos complejos clonales (CC). Se observó la presencia de 57 patrones únicos (45,2%) y 69 cepas agrupadas (54,8%) en 20 complejos clonales (Figura 59.) formados por un mínimo de 2 cepas y un máximo de 9 cepas. En 18 de los 20 complejos clonales las cepas pertenecen solo a Ecuador o solo a España y en el CC2 y CC4 podemos observar que están formados por cepas de ambos países.

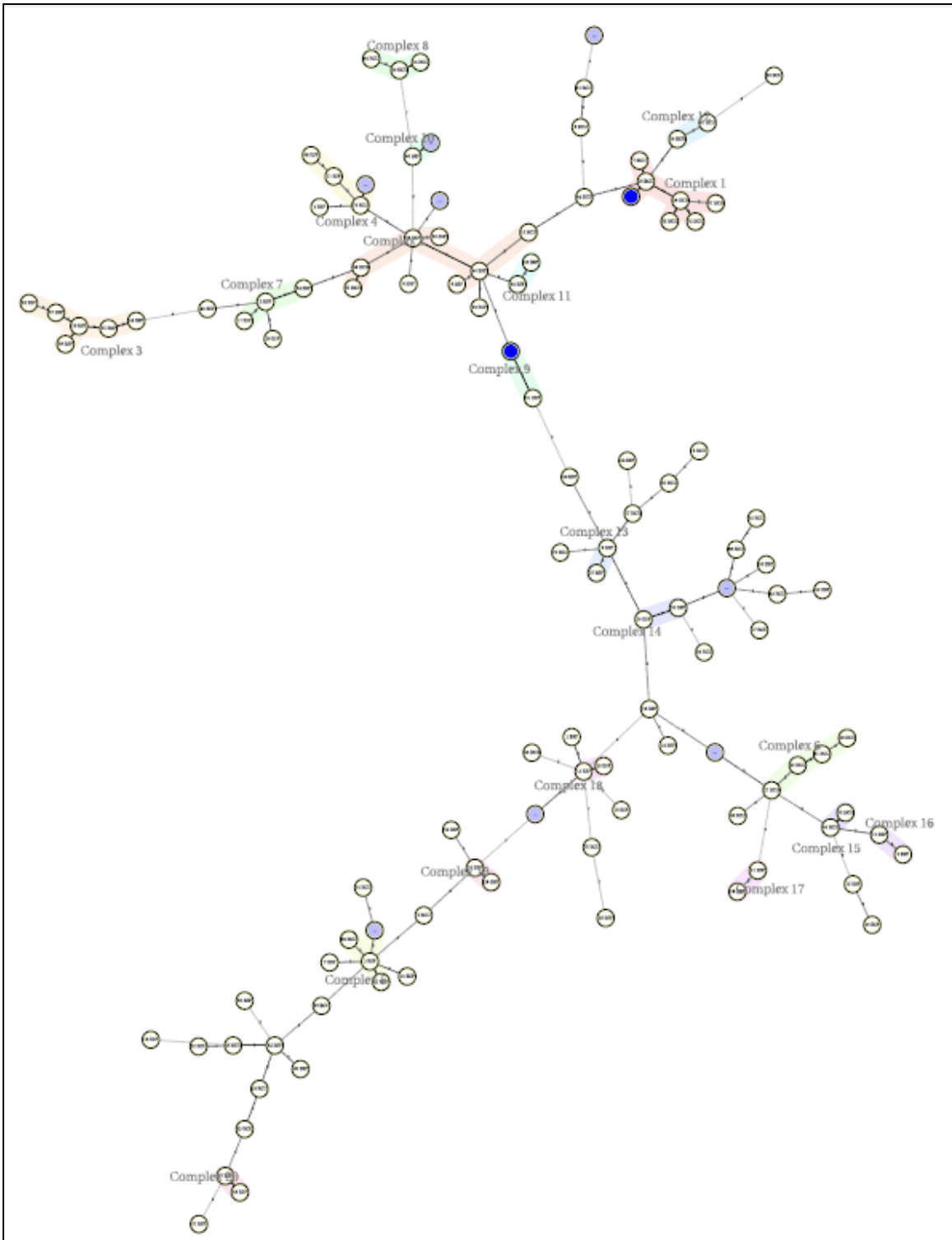


Figura 58: Arbol de mínima expansión construido a partir de aislados clínicos españoles y ecuatorianos (la diferencia máxima entre complejos clonales es de 2 loci)(www.miru-vntrplus.org).

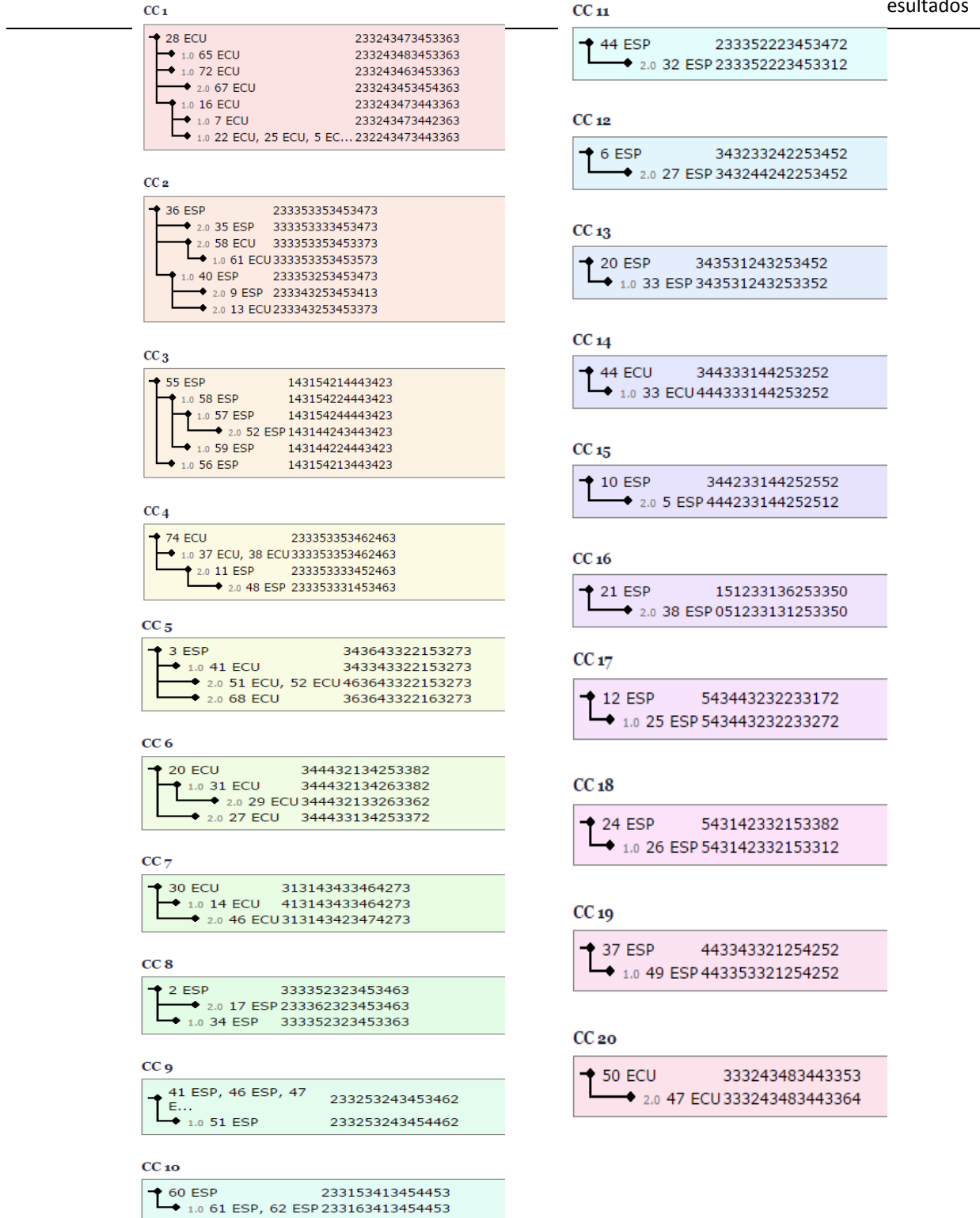


Figura 59: Distribución de los aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* ecuatorianos y españoles en veinte complejos clonales (www.miru-vntrplus.org).

Al comparar las cepas de España y Ecuador con las cepas que conforman la base de datos de la plataforma www.miru-vntrplus.org se puede establecer los posibles linajes y sublinajes con los cuales están relacionadas las cepas en estudio y así se puede obtener la siguiente distribución (Figura 60):

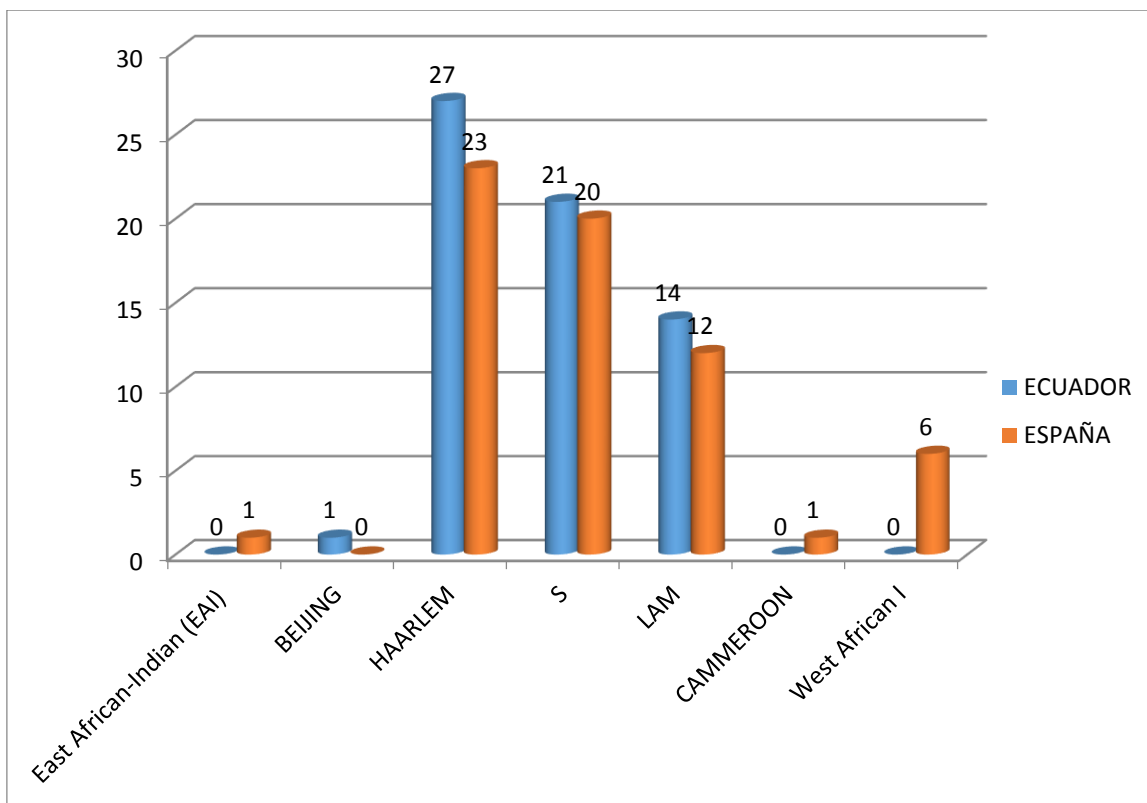


Figura 60: Distribución de los aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* ecuatorianos y españoles en distintos linajes y sublinajes.

El sublinaje East African-Indian (EAI) pertenece al linaje 1 y geográficamente se encuentra al sureste de Asia, en India y en Africa Occidental, el sublinaje Beijing pertenece al linaje 2 y es originario de Asia, los sublinajes LAM, Haarlem, S, y Cameroon pertenecen al linaje 4 y están distribuidos en el continente Americano, Europa y África. El sublinaje West African I pertenece al linaje 6 y es originario de África.

Los aislados clínicos de España estuvieron relacionados en su mayoría con el linaje 4 o Euro-Americano que incluye; Cammeroon (1,59%), Haarlem (36,51%), S (31,75%), y LAM

(19,05%); el linaje 6 o West Africa I (9,53%), el linaje 1 o EIA (1,59%), lo cual se justifica por los movimientos migratorios de América, África y Europa hacia España. Para el caso de Ecuador las cepas estaban relacionadas con el linaje 4: Haarlem (42,86%), S (33,33%), y LAM (22,22%) que está acorde por la ubicación geográfica, pero existe también una cepa relacionada con el linaje 2 Beijing (1,59%) originario de Asia, lo cual representa un hallazgo importante ya que este linaje tiene características de mayor virulencia y farmacoresistencia. El poder discriminatorio de la técnica de MIRU-VNTR fue calculado mediante el índice discriminatorio de Hunter Ganston (HGDI), obteniéndose un valor de 0,9843.

Al comparar las dos técnicas de genotipado AFLP y MIRU-VNTR (Tabla 8) podemos observar que MIRU-VNTR presenta una clara ventaja al tener un HGDI cercano a 1.

Técnica	No.Cepas	No. Clusters	Patrones Unicos	HGDI
AFLP	126	12	5	0.5812
MIRU-VNTR	126	20	57	0.9843

Tabla 8. Comparación de HGDI entre AFLP y MIRU-VNTR

5. DISCUSSION

La Tuberculosis actualmente se ubica junto al VIH como causa principal de muerte en todo el mundo. En el 2014 murieron 1,5 millones de personas (1,1 millón HIV-negativo y 0,4 millones HIV-positivo) y aunque las tasas de mortalidad y de prevalencia han disminuido a nivel mundial, las muertes registradas por esta causa son inaceptables por tratarse de una enfermedad curable. Las regiones de las Américas y Pacífico Occidental han alcanzado las tres metas de reducción de la carga de TB (incidencia, prevalencia y mortalidad) para el año 2015, propuestas por la OMS en su programa STOP TB, mientras que en las regiones de África, Mediterráneo Oriental y Europa han disminuido pero no con la rapidez necesaria para alcanzar las metas mundiales fijadas en el contexto de los Objetivos de Desarrollo del Milenio para el 2015, esto es: “Haber detenido y comenzar a reducir, en 2015, la incidencia de la malaria y otras enfermedades graves”. La OMS indica que entre 1995 y 2012 se suministró con éxito el tratamiento de la Tuberculosis a 56 millones de personas, y se salvaron un número estimado de 22 millones de vidas. Sin embargo, la tuberculosis multirresistente, que surgió principalmente como consecuencia de tratamientos inapropiados, sigue planteando problemas. Ante esta situación, la OMS propone cinco acciones prioritarias desde la prevención hasta la curación para resolver la epidemia de TB-MR: 1) Tratamiento de gran calidad de la TB fármaco sensible, con el fin de prevenir la TB-MR; 2) Expansión de las pruebas rápidas y detección de los casos de TB-MR; 3) Acceso inmediato a una atención médica de calidad; 4) Control de la infección, y 5) Mayor compromiso político, en particular una financiación suficiente de las intervenciones actuales, así como de la investigación para desarrollar nuevos productos diagnósticos, fármacos y tratamientos (OMS 2014).

La OMS ha elaborado la Estrategia Mundial y Metas para la prevención, la atención y el control de la Tuberculosis después de 2015, que fue aprobada por todos los Estados Miembros en la Asamblea Mundial de la Salud de mayo de 2014. El objetivo global de la estrategia consiste en poner fin a la epidemia mundial de TB y se fija para 2035 las metas de reducir la mortalidad por TB en un 95% y la incidencia de la enfermedad en un 90% (en ambos casos en comparación con las cifras de 2015).

Enmarcados en el contexto de las acciones prioritarias de la OMS, el presente trabajo ha pretendido aportar desde el área de la Epidemiología Molecular una herramienta útil que permita conocer la distribución geográfica de los linajes circulantes, su virulencia y su relación con la resistencia a fármacos mediante la genotipificación,

usando técnicas moleculares eficaces, específicas y económicas, que permitan contribuir en la toma de decisiones relacionadas con el esquema de tratamiento y el control de la infección.

Para la realización de este trabajo se seleccionaron inicialmente un total de 131 aislados clínicos obtenidos a partir de muestras de pacientes durante el período de tiempo comprendido entre los años 2006 y 2013. El 69,45% de las muestras eran de origen respiratorio, y en su mayoría las cepas procedían de pacientes de género masculino (64,12%), siendo el grupo de edad con mayor representación el de 31 a 50 años (41%). Estos datos se correlacionan bien con los publicados por la OMS en su informe global 2015, donde menciona que en el año 2014 a nivel mundial 9,6 millones de personas enfermaron por TB, de los cuales 5,4 millones son hombres, 3,2 millones son mujeres y 1,0 millón son niños; además la enfermedad se presenta en adultos en edad económicamente productiva, al igual que ocurre en nuestro trabajo, lo cual es preocupante ya que se trata de una enfermedad que compromete el desempeño laboral y puede afectar el sustento familiar.

De los 131 aislados seleccionados inicialmente en nuestro estudio, 68 se obtuvieron de pacientes ecuatorianos y 63 aislados clínicos procedían de pacientes que vivían en España. Para realizar la genotipificación mediante las técnicas AFLP y MIRU-VNTR, se consideraron 126 aislados que habían sido identificados como pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* quedando descartadas 5 cepas de pacientes ecuatorianos que no pudieron ser identificados como MTBC.

La identificación de las especies que forman parte del complejo *Mycobacterium tuberculosis* ha estado clásicamente basada en métodos fenotípicos con resultados muy subjetivos ya que las especies que forman parte de este complejo presentan una estrecha relación genética. Las diferentes especies del complejo poseen una homología superior al 95% en la hibridación ADN-ADN, tienen idénticas secuencias en los genes *rpoB*, 16S ARNr y en el espacio intergénico de los genes 16S y 23S ARNr. Solamente la subespecie *M. canettii* difiere en el gen *hsp65*. Igualmente, las especies pertenecientes al complejo tienen el mismo perfil lipídico, excepto *M. bovis* – BCG, que presenta pequeñas diferencias con el resto. Las diferencias básicas entre las especies del complejo en sí radican en su huésped, origen geográfico y patogenicidad (Van Soolingen *et al* 1997).

Koser *et.al.* menciona que se debe evaluar rigurosamente la diversidad genética de MTBC, ya que la resistencia intrínseca a uno o varios antibióticos afecta el esquema del tratamiento, por lo tanto es importante establecer el diagnóstico diferencial entre las especies del complejo. La especie *M. bovis* es intrínsecamente resistente a pirazinamida y *M. bovis*-BCG se utiliza como complemento para potenciar la actividad inmunógena en el tratamiento de algunas enfermedades por su alto poder antigénico (Huard *et.al.* 2006). Cuando se analiza la resistencia a INH (isoniacida) en diferentes linajes, Gagneux *et. al.* encuentra que el linaje Euro-Americano tiene más probabilidades de albergar la mutación S315T katG (Rv1908c), mientras que la resistencia en el linaje Beijing se asocia con mutaciones en otro lugar del gen y en el linaje Indo-oceánico, las mutaciones son más comunes en el promotor inh (Rv1484). Además, el nivel de resistencia transmitida por mutaciones particulares puede variar entre diferentes linajes (Fenner L, *et al.* 2012). Esto destaca el valor clínico de conocer la causa de la resistencia a los fármacos; de este modo, la importancia de conocer la diversidad genética radica en el estudio de la resistencia intrínseca y adquirida a determinadas drogas, pues permite el desarrollo de pruebas diagnósticas para la detección de resistencia a los medicamentos y de nuevos antibióticos.

Por otra parte, la diferenciación de las especies de este complejo es una herramienta útil para un mejor conocimiento de la epidemiología de la enfermedad. Según el Sistema de Información Microbiológica del Instituto de Salud Carlos III, *M. tuberculosis* fue el agente causal de la mayoría de los casos de tuberculosis diagnosticados en España entre los años 2005 y 2006 (99,6%) (URL http://www.isciii.es/htdocs/centros/epidemiologia/informacion_microbiologica/sim2006.pdf). De las 12 cepas identificadas como *M. tuberculosis* “variedad asiática”, 10 se aislaron de pacientes de ese origen geográfico y solo en 2 casos los pacientes fueron españoles. De igual manera, se identificaron 74 cepas como *M. africanum*; todas estas cepas, excepto 3, se aislaron de pacientes inmigrantes procedentes de África, mayoritariamente África subsahariana. Se ha observado un aumento paulatino en el número de aislamientos durante los últimos años, lo que coincide con el aumento de la inmigración procedente de países en los que *M. africanum* es causante de un número muy elevado de casos de tuberculosis. La nacionalidad de los enfermos con tuberculosis que causa *M. africanum* y *M. tuberculosis* “variedad asiática” confirma la relación entre la especie y la procedencia geográfica, pero cada vez es más frecuente aislar estas especies de pacientes autóctonos

que nunca han visitado esos continentes debido a los movimientos migratorios y a la integración de estas personas en la sociedad (Herrera-León 2009).

Somoskovi A. *et. al.* (2008) utilizaron el ensayo GenoType® MTBC para evaluar la capacidad de detección e identificación de los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Analizaron 35 cepas de referencia, 157 aislados clínicos y 79 frotis positivos de muestras clínicas, demostrando sensibilidad y especificidad elevadas para el ensayo mencionado y además, pudiéndose detectar e identificar correctamente el 93,2% de las muestras pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*, con excepción, al igual que comentan Richter *et. al.* (2003), de *M. canettii* y *M. africanum* tipo 2. Sin embargo, la escasa prevalencia de estas especies en población no africana y sus diferencias fenotípicas con *M. tuberculosis*, minimizan la importancia de la falta de discriminación, dada su cercanía genética.

En nuestro estudio el 100% de los aislados clínicos de España y la cepa control *M. tuberculosis* ATCC25177 hibridaron con las sondas específicas generando patrones de bandas correspondientes a *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG y *M. africanum*, con la siguiente distribución: 87,3% para *M. tuberculosis*, 9,5 % para *M. africanum* y 3,17 % para *M. bovis* BCG.

GenoType® MTBC, resultó para nosotros una técnica de fácil realización, con un sistema de lectura e interpretación de bandas accesible que puede ser incorporado fácilmente en el trabajo de rutina clínica, de manera concordante a lo descrito por Kurtoglu *et. al.*(2014) que encuentra valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo para este método del 95,7%, 100%, 100%, y 99,1%, respectivamente; además, con la finalidad de validar siempre el correcto funcionamiento del test y la actividad de los reactivos, cada tira incluye 2 zonas de control: a) una zona de control de conjugado para comprobar la unión del conjugado a la tira y una reacción cromogénica correcta y b) una zona de control universal que detecta, todas las micobacterias y miembros del grupo de bacterias gram-positivas con un alto contenido de G+C. Esto nos permite tener la certeza de los resultados obtenidos. Por todo ello, en nuestro estudio al igual que en los ensayos realizados por otros autores, como Richter *et al* (2003), este sistema comercial se perfila como una técnica muy útil y fácil de aplicar en la identificación rutinaria de especie del complejo *M. tuberculosis*.

Para el caso de los aislados clínicos de Ecuador no se pudo realizar el ensayo GenoType^R MTBC por motivos de financiación, por lo que se buscó una metodología alternativa que permitiera discriminar entre las cepas que pertenecen al MTBC de aquellas que no. Para ello se empleó una técnica de inmunoanálisis cromatográfico, el ensayo BD MGIT TBc (Becton Dickinson), que utiliza como diana de detección la fracción proteica micobacteriana MPT64 segregada por las células del complejo durante el cultivo y que ha sido diseñada para aplicarse en cultivos líquidos. Se debe tener en cuenta que el resultado del ensayo BD MGIT TBc puede ser negativo en el caso de algunas cepas secundarias de *Mycobacterium bovis* BCG, así como también, cuando existen mutaciones en el gen *mpb64* de *M. tuberculosis* o cuando hay una reducción importante en la cantidad de proteína secretada, necesaria para la detección (Machado *et.al.* 2014).

De los 68 aislados clínicos analizados, en 63 casos obtuvimos un resultado positivo, que indicaba su pertenencia al complejo *Mycobacterium tuberculosis* y en 5 casos obtuvimos un resultado negativo. El dispositivo BD MGIT TBc resultó en nuestro ensayo una técnica simple, rápida y de fácil realización e interpretación, que no requería preparación previa de la muestra o instrumentación adicional, por lo que desde nuestro punto de vista su uso resulta recomendable en países con recursos limitados en los que la implementación y uso de métodos moleculares no es posible, de manera coincidente a otros autores como Martin *et.al.* (2011) quienes aplicaron el test BD MGIT TBc a 92 cultivos informando una sensibilidad y especificidad del 98,5% y 100% respectivamente; Machado *et.al.* (2014) evaluó 100 cultivos mediante el test BD MGIT TBc y obtuvo una sensibilidad del 90,14% y especificidad del 100%; Brent *et.al.* (2011) realizó un metaanálisis evaluando tres pruebas comerciales para la detección de la proteína MPT64 en 83 aislados pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* obteniendo una sensibilidad del 98,1% y especificidad de 99,6% para el test BD MGIT TBc. En nuestro caso y dada la limitación de los recursos técnicos, nos planteamos si las cinco cepas que habían dado un resultado negativo realmente no pertenecían al complejo *M. tuberculosis* o si eran fallos de identificación debido a las limitaciones inherentes a la propia técnica (informadas por el fabricante) o incluso al hecho de haber aplicado el dispositivo a un medio líquido no incubado en un sistema automatizado. Por ello, se realizaron posteriormente subcultivos de las mismas e identificación mediante métodos fenotípicos convencionales (características morfoculturales y bioquímicas) que nos llevaron a confirmar que

realmente se trataba de aislados no incluidos en el complejo, confirmando la elevada especificidad del método.

Para el genotipado molecular se emplearon dos técnicas basadas en PCR: AFLP y MIRU-VNTR. La técnica AFLP desarrollada por Lin and Kuo, (1995); Vos *et al.*, (1995) fue modificada por Viader-Salvadó *et al.* (2009), proponiendo una variante simplificada de AFLP, la cual usa una sola enzima de restricción (*XhoI*), que corta una sola vez dentro de la secuencia IS6110, un adaptador y un solo primer para la PCR con una guanina como oligonucleótido de selección. La visualización de los fragmentos amplificados se hace mediante electroforesis en geles de agarosa y visualización con bromuro de etidio. Estas condiciones además de la necesidad de poca cantidad de ADN para el ensayo, permiten reducir considerablemente el tiempo empleado en su realización y el coste de la técnica, lo que tiene gran importancia a la hora de potenciarla como método útil en países en vías de desarrollo o cuando se pretende realizar un cribado preliminar.

El análisis del polimorfismo mediante AFLP simplificado, resultó en nuestro caso una técnica sencilla de aplicar, de fácil preparación y con una reproducibilidad y tipabilidad del 100%. Fueron suficientes 200 ng de ADN genómico para este ensayo, a diferencia de la técnica de RFLP-IS6110 que requiere altas concentraciones de ADN con alta pureza, además de que muestra baja reproducibilidad (Kremer *et al.* 1999). Esto se debe a que detecta variaciones en el número de repeticiones de la secuencia IS6110 en el genoma de *M. tuberculosis* (Van Embden, 1993) con lo cual si hay menos de 6 copias existe dificultad en su análisis (Philipp *et al.* 1996); en el caso de la técnica AFLP simplificado, se evalúa variaciones en todo el genoma de *M. tuberculosis* provocados por la acumulación de sustituciones de bases.

Mediante la técnica AFLP se obtuvieron de siete a doce fragmentos de restricción con tamaños comprendidos entre 140 pb y 760 pb que dieron lugar a 12 patrones de restricción de modo similar a los descrito por Viader-Salvadó *et al.* (2009). Los patrones P1 y P2 fueron los más prevalentes para los aislados clínicos de Ecuador y España, además de estar presentes a lo largo de todo el periodo de estudio (2006 a 2013) y encontrarse distribuidos en todas las zonas geográficas de las que procedían los pacientes, sugiriendo una circulación de genotipos muy similar en los dos países. Al analizar los resultados obtenidos mediante la prueba GenoType® MTBC y AFLP, se

observó que el *cluster* P1 estaba formado por cepas identificadas como *M. tuberculosis* y todas las cepas identificadas como *M. africanum* y el *cluster* P5 estaba formado por cepas identificadas como *M. tuberculosis* y todas las cepas *M. bovis* BCG, lo que parece indicar que la técnica AFLPs permite distinguir las cepas de *M. africanum* de las cepas *M. bovis* BCG pero no hace distinción entre éstas y las cepas identificadas como *M. tuberculosis*, pues las agrupa en un mismo *cluster*. Huys *et.al.* (2000) evalúa la capacidad de discriminación de la técnica de AFLP radiactivo para diferenciar cepas de *M. bovis*, *M. tuberculosis* y *M. ulcerans* resultando adecuada como herramienta taxonómica para estas especies: debido al bajo grado de variación genética, la metodología de AFLP radiactiva parece menos concluyente para la diferenciación de cepas individuales entre *M. bovis* y *M. tuberculosis*, pero con respecto a *M. ulcerans* (especie más heterogénea), AFLP demostró ser un método epidemiológico prometedor.

En nuestro estudio se describen pacientes con más de una muestra en los cuales los diferentes aislamientos presentan el mismo patrón de restricción: por ejemplo hay un paciente en el que las cepas procedentes tanto del líquido cefalorraquídeo como del jugo gástrico presentaron el mismo patrón de restricción lo que indica la diseminación de la misma cepa en todo el organismo. Sin embargo, también describimos en nuestro trabajo cepas con distinto patrón de restricción procedentes de un mismo paciente, como es el caso de un paciente que presentó dos patrones de restricción en los aislamientos obtenidos de dos muestras (20 y 33) de origen respiratorio (esputo y aspirado bronqueoalveolar) obtenidas con una diferencia de un mes; esto podría deberse a una infección mixta, y aunque en este caso se trataba de dos cepas sensibles a los cinco fármacos antituberculosos básicos, se debe tener en cuenta, por la posibilidad de que se trate de cepas con diferente patrón de sensibilidad.

Nos propusimos determinar el poder discriminatorio de las técnicas empleadas en la tipificación de los aislados para establecer su utilidad como marcador. Existen diversos factores numéricos que son capaces de demostrar cuál es el método de tipificación más eficiente: tipabilidad, o porcentaje de cepas diferentes que pueden ser identificadas por un marcador, reproducibilidad, o porcentaje de cepas que dan el mismo resultado en repetidos ensayos, y poder de discriminación. El poder discriminatorio de un método, o su capacidad para distinguir entre cepas no relacionadas, está determinado por el número de tipos definidos por el ensayo y su frecuencia (Hunter & Gaston; 1988). Estos autores

propusieron un índice numérico de discriminación basado en la probabilidad de que dos cepas no relacionadas sean caracterizadas como pertenecientes a un mismo tipo, el índice de diversidad de Simpson, que permite la comparación de métodos de tipificación y seleccionar aquel que muestre un mayor poder de discriminación. El índice viene dado por una ecuación que puede ser aplicada tanto para la comparación directa de diferentes métodos, como para el análisis del poder de discriminación de esquemas de tipificación combinados. Según consideran Hunter & Gaston (1988), el nivel aceptable de discriminación dependerá en cada caso de un gran número de factores, pero un índice mayor del 0,90 sería lo deseable para que los resultados pudieran ser interpretados con confianza.

Dada la homogeneidad de nuestros aislados, el poder discriminatorio de la técnica AFLP calculado tras la aplicación del índice de diversidad de Simpson fue de 0,5812 encontrándose por debajo de lo que sería deseable (0,90) según Hunter & Gaston (1988). Así pues, a pesar de la relativa clonalidad observada y tomando en consideración las ventajas que ofrece la técnica simplificada de AFLP frente a la técnica tradicional, y la posibilidad de intentar aumentar el poder discriminatorio usando también un *primer* XP-C, para combinar los resultados obtenidos con XP-G como lo describen para el método convencional Goulding *et. al.* (2000), consideramos que el análisis del polimorfismo mediante AFLP es un método apropiado para llevar a cabo la tipificación de cepas pertenecientes al MTBC con fines epidemiológicos, al menos en estudios preliminares en comparación con la técnica RFLP-IS6110.

La técnica de genotipificación MIRU-VNTR desarrollada por Supply (2000), se basa en amplificaciones por PCR usando *primers* específicos para las regiones flanqueantes de los VNTRs, determinación de tamaño de los amplicones mediante migración electroforética y asignación de número de copias presentes para cada *locus* amplificado que en este caso fueron 15 loci. La técnica MIRU-VNTR permitió obtener el genotipo del 100% de los aislados incluidos en este estudio. La técnica es reproducible, de bajo coste y metodológicamente más sencilla que la técnica de AFLP simplificado. Sin embargo la asignación alélica en base a geles de agarosa requiere experiencia, lo cual se puede solucionar mediante electroforesis capilar sin perder de vista un posible incremento en el costo de la prueba.

De los 15 loci analizados, se pudo observar un menor poder discriminatorio de los loci 1644(0,455), 580(0,21) y 3192(0,36) con respecto a lo observado para los loci 2163b(0,80), 4052(0,78) y 802(0,79) que fueron altamente discriminatorios de manera concordante a los resultados aportados por autores como Alonso *et.al.* (2008) cuyo poder discriminatorio fue el siguiente 4052(0,8), 2163b(0,78), y 802(0,73). Comas *et.al.* (2009) evaluó el poder discriminatorio de 24 miru para cada uno de los seis linajes, concluyendo que los loci con mayor poder discriminatorio para el linaje 1, 2 y 4 son 2163b, 1955, 4052, 3690 y 802; para el linaje 3 son 4156, 3690, 2996, 802 y 960 para el linaje 5 son 2163b, 4052 y 1955 y para el linaje 6 son 1955, 960, 4052 y 580. Esto indica que en este estudio se utilizaron los loci con mayor poder discriminatorio para todos los linajes posibles, asegurando de esta manera la tipificación de las cepas independientemente de su origen.

MIRU-VNTR agrupó al 44.4% de cepas aisladas en Ecuador en 8 complejos clonales formados por un mínimo de 2 cepas y un máximo de 9 cepas. Para el caso de cepas aisladas en España, el 60,3% fueron agrupadas en 14 complejos clonales formados por un mínimo de 2 y un máximo de 6 cepas. Alonso *et.al.* (2008) indica un porcentaje de agrupamiento del 34,4% en 16 *clusters* integrados por 2 y hasta 14 cepas. Para el caso de Ecuador pudimos detectar un complejo clonal con vínculos epidemiológicos (las cepas 5, 22 y 25 provienen de la provincia de Sucumbíos; la cepa 5 presenta un mirutipo idéntico a las cepas 22 y 25 que proceden de un paciente diferente, además el patrón de sensibilidad a fármacos de las cepas 22 y 25 corresponde a un patron multidrogo-resistente (MDR-TB). Para el caso de España se detectó un complejo clonal con vínculo epidemiológico (cepas 60, 61 y 62 que fueron aislados de pacientes originarios de Rumania y existía un parentesco directo, eran padre e hijo). Podemos decir que todo esto sugiere (cepas que integran un mismo *cluster*) una transmisión reciente de la enfermedad siempre y cuando existan vínculos epidemiológicos entre ellas como el área geográfica (de domicilio, trabajo, área de hospitalización, permanencia en cárceles, entre otros...). Existen otras cepas con idéntico mirutipo que corresponden a diferentes pacientes y han sido ubicados como patrones únicos (cepas 10-11 corresponden a pacientes originarios del cantón Pangua-Ecuador aislados en el 2009 y 2010 respectivamente; cepas 37-38 proceden de pacientes distintos originarios de la provincia de Pichincha-Ecuador al igual que las cepas 40-45). Estas cepas huérfanas sugiere casos de reactivaciones endógenas de la enfermedad.

El poder discriminatorio de la técnica de MIRU-VNTR fue calculado mediante el índice discriminatorio de Hunter Ganston (HGDI), obteniéndose un valor deseable de 0,9843 que está muy cercano al descrito en España por Alonso *et.al.* (2008) que es de 0,995, al obtenido por Cáceres *et.al.* (2014) en Perú que es de 0,993 y al informado por Dantas *et.al.* (2015) en Brazil que fue de 0,9991 aunque este último utilizó un set de 24-miru.

La presencia de un mayor número de *clusters* o complejos clonales obtenidos mediante la técnica MIRU-VNTR (20) en relación con la técnica AFLP simplificado (12), deja ver la mayor capacidad de discriminación (HGDI 0,9843) de dicho método, ya que presenta un HGDI cercano a 1, además MIRU-VNTR permite diferenciar entre las especies del MTBC ya que es posible observar que el cluster CC3 está integrado solamente por cepas identificadas como *M. africanum* y el CC16 solamente incluye las cepas de *M. bovis* BCG, lo que no fue posible mediante AFLP.

Al comparar los mirutipos de las cepas aisladas en España con los mirutipos de las cepas de referencia de la base de datos www.miru-vntrplus.org se obtuvo la presencia de los linajes 1 (EIA), 4 (LAM, Haarlem, S, y Cameroon) y 6 (West African I), mientras que en los aislados clínicos de Ecuador se encontró el linaje 4 o euroamericano y el linaje 2 (Beijing) originario de Asia. Según Gagneux *et. al.* (2005) menciona que la estructura de la población mundial de *M. tuberculosis* se define por seis linajes filogeográficos, cada uno asociado a poblaciones humanas específicas por lo tanto los movimientos migratorios desde América, Africa y Europa hacia España, justifican la variedad de linajes, al igual que el caso del linaje 2 presente en los aislados clínicos de Ecuador. Balcells *et.al.* (2015) genotipifica 103 cepas colectadas en Chile y los linajes con mayor representación fueron LAM (34%) y T (33%) , seguido de Haarlem (16,5%). La familia Beijing estuvo representada por dos casos (1,9%) uno de los cuales correspondía a un emigrante peruano. En Río de Janeiro-Brazil, Vasconcellos *et.al.* (2014) clasifica 218 aislados clínicos y los genotipos predominantes correspondieron a LAM (62,4%), Haarlem (21,5%), T (9,6%) pero también informan sobre un caso de la familia Beijing (0,45%). En nuestro caso la cepa relacionada con la familia Beijing es sensible a los fármacos, pero existen estudios en los cuales asocian a este linaje con características de mayor virulencia debido a que se asocia con perfiles de farmacorresistencia (Tao Luo *et.al.* 2015)(Ribeiro *et. al.* 2014); es importante tener en cuenta que Ecuador limita al sur con Perú en donde existen informes de cepas pertenecientes a este linaje ([Alonso *et.al.* 2011] [Cáceres *et.al.*2014] [Ritacco *et.al.* 2008]), pudiéndose tratar de una cepa importada.

Al comparar los resultados de AFLP y MIRU-VNTR para el caso de un paciente residente en España con dos muestras respiratorias (esputo y BAS) que presentó diferente patrón de restricción mediante AFLP (P1 y P6) se observó que el mirutipo de las cepas varió en un locus (miru 52) pero las dos muestras pertenecían al linaje 4 (S); y para el caso de 9 pacientes residentes en Ecuador con dos muestras con igual patrón de restricción mediante AFLP, seis de ellos presentaron igual mirutipo, 2 pacientes presentaron una diferencia de un locus (miru 26 y miru 42) y en un paciente el mirutipo varió en dos loci (ETR A y QUB 26) pudiendo ubicar a las cepas en distintos sublinajes pero todas incluidas en el linaje 4.

La técnica de MIRU-VNTR reduce considerablemente el tiempo requerido para identificar infecciones recientes y distinguirlas de reactivaciones, además nos permite investigar posibles casos de contaminación cruzada en los laboratorios en el momento de procesar muestras con alta carga bacteriana.

La genotipificación molecular ha cambiado el concepto de la epidemiología pasando de estudios retrospectivos a estudios de casos en tiempo real, lo cual nos permite conocer los genotipos circulantes, la asociación en *cluster* y la dinámica de la transmisión de la enfermedad, dando la oportunidad de establecer estrategias de control efectivas.

Este trabajo en el área de la Epidemiología Molecular es un estudio retrospectivo que ha dado una visión de la situación de la Tuberculosis en un sector de España y Ecuador, es importante el uso de las herramientas de genotipado de manera rutinaria que permitan realizar estudios epidemiológicos a gran escala y en tiempo real con la posibilidad de realizar un mejor control de la enfermedad principalmente en países con movimientos migratorios importantes como son el caso de España y Ecuador.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en nuestro estudio nos han permitido obtener las siguientes conclusiones:

1. La identificación a nivel de especie, realizada mediante el ensayo de hibridación inversa GenoType® MTBC en los aislados clínicos españoles, muestra un predominio de cepas pertenecientes a la especie *M. tuberculosis*, tanto en pacientes autóctonos como inmigrantes. Sin embargo, todos los aislados identificados como *M. africanum* pertenecían a pacientes de origen africano. Esto nos indica que la estructura de la población mundial de *M. tuberculosis* complex está asociada a poblaciones humanas específicas por lo tanto los movimientos migratorios juegan un papel muy importante en la diseminación de la enfermedad.
2. El ensayo de hibridación inversa GenoType® MTBC es un método automatizado y fácil de realizar perfilándose como una técnica muy útil en la rutina del laboratorio para la identificación de la mayoría de especies incluidas en el complejo *M. tuberculosis*, sin embargo la técnica BD MGIT TBc puede ser usada como una prueba rápida para identificar aquellas cepas pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* en laboratorios con recursos económicos más limitados o siempre que sea suficiente la identificación a nivel de complejo.
3. Las técnicas moleculares basadas en PCR (AFLP simplificada y 15-MIRU-VNTR) seleccionadas en este estudio para caracterizar molecularmente a los aislados clínicos pertenecientes a MTBC en España y Ecuador, demostraron ser reproducibles y económicas (al usar iniciadores simples y electroforesis en geles de agarosa), permitiendo conocer la estructura poblacional de las micobacterias en un periodo de tiempo comprendido entre 2006 a 2013.
4. La clonalidad obtenida mediante la técnica AFLP simplificada y su moderado poder discriminatorio (HGDI 0,5812) nos sugiere que es una técnica adecuada para la realización de estudios epidemiológicos iniciales del complejo *M. tuberculosis* ya que es un método reproducible y de

sencilla realización. Aunque, quizás podría mejorarse con la incorporación de un iniciador con otro nucleótido de selección.

5. La técnica MIRU-VNTR presentó un índice de discriminación (HGDI 0,9843) muy cercano a lo deseable, permitió además determinar los linajes de todas las cepas en estudio, siendo los 15 loci seleccionados para este ensayo adecuados e informativos, lo que convierte este método en una técnica de elección para estudios de genotipificación y epidemiología molecular
6. La distribución de los aislados clínicos en los diferentes complejos clonales resultantes de la técnica MIRU-VNTR permite investigar vínculos epidemiológicos entre los integrantes del *cluster* al tratarse de una posible cadena de transmisión de la enfermedad; a diferencia de los casos huérfanos que corresponden a una reactivación endógena.
7. El linaje con mayor prevalencia para los aislados clínicos de España y Ecuador corresponde al linaje 4 (LAM, Haarlem, S, y Cameroon) o Euroamericano lo que se relaciona con los movimientos migratorios constantes entre estos dos países, pero llama la atención la presencia de una cepa relacionada con el linaje 2 Beijing en territorio ecuatoriano debido a que este linaje es originario de Asia y se asocia con fármaco-resistencia. Esto obliga a realizar un estudio epidemiológico en la población de la cual se aisló esta cepa para saber si existen casos activos y poder evitar la propagación de cepas
8. Esta investigación ha permitido realizar la transferencia tecnológica entre España y Ecuador mediante la correcta estandarización e implementación de las técnicas AFLP simplificada y 15 MIRU-VNTR en el servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Valencia (España) y en el Laboratorio de Biotecnología Humana de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE (Ecuador), lo cual da la posibilidad a los dos organismos de aportar conocimientos en epidemiología molecular sobre ésta

enfermedad desde el Centro Asistencial (España) o desde la Academia (Ecuador) en beneficio de la población más vulnerable.

9. El uso rutinario de técnicas de genotipificación reproducibles, con alto poder discriminativo y con coste-beneficio adecuado permite la generación de una base de datos de genotipos propia, útil para identificar nuevos brotes y poder realizar prevención, vigilancia y control de la enfermedad.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Alcaide F., Caylá J. 2011. Update on Tuberculosis, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 29(Supl 1): 1
2. Alcaide F, 2009. Qué aporta la biología molecular al diagnóstico de la tuberculosis?, *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 27 (9): 493-495
3. Alcaide F., Benítez MA, Escriba JM, Martín R. 2000. Evaluation of the Bactec MGIT960 and the MB/BacT systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens and for species identification by DNA AccuProbe *J. Clin. Microbiol*. 38:398-401.
4. Alonso M., Y. Navarro, F. Barletta, M. Martínez Lirola, E. Gotuzzo, E. Bouza and D. García de Viedma. 2011. A novel method for the rapid and prospective identification of *Beijing Mycobacterium tuberculosis* strains by high-resolution melting analysis. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 349–357.
5. Alonso-Rodríguez, N., Martínez-Lirola, M., Herránz, M., Sanchez-Benitez, M., Barroso, P., INDAL-TB group de Viedma, D. G. (2008). Evaluation of the new advanced 15-loci MIRU-VNTR genotyping tool in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology studies. *BMC Microbiology*, 8, 34. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-8-34>
6. Allix-Béguec C., Harmsen D., Weniger Th., Supply Ph. and Niemann S. 2008. Evaluation and Strategy for Use of MIRU-VNTRplus, a Multifunctional Database for Online Analysis of Genotyping Data and Phylogenetic Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 2692-2699.
7. Andrew J. Brent, Daisy Mugo, Robert Musyimi, Agnes Mutiso, Susan Morpeth, Michael Levin, and J. Anthony G. Scott. 2011. Performance of the MGIT TBc Identification Test and Meta-Analysis of MPT64 Assays for Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Liquid Culture. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Dec. 49:4343–4346. doi:10.1128/JCM.05995-11.
8. Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Domínguez L. 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *Caprae* Aranaz *et al.* 1999 to species rank as *Mycobacterium*

- caprae* comb. Nov., sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53, 1785-1789.
9. Bachellier, S., Gilson, E., Hofnung, M., and Hill, C.W. 1996. Repeated sequences. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, Neidhardt, F. C. et al. (eds) Washington, DC: American Society for Microbiology Press pp. 2013-2040.
 10. Balcells, María Elvira; García, Patricia; Meza, Paulina; Peña M., Carlos; Cifuentes Díaz, Marcela; Couvin, David; Rastogi, Nalin. 2015. A First Insight on the Population Structure of *Mycobacterium tuberculosis* Complex as Studied by Spoligotyping and MIRU-VNTRs in Santiago, Chile. PLoS ONE 10(2): e0118007
 11. Barniol J, Niemann S, Louis VR, Brodhun B, Dreweck C, Richter E, et al. 2009. Transmission dynamics of pulmonary tuberculosis between autochthonous and immigrant sub-populations. BMC Infect Dis. 9:197.
 12. Behr, M.A., Wilson, M.A., Gill, W.P., Salamon, H., Schoolnik, G.K., Rane, S., et al. 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. Science 284: 1520-1523.
 13. Brent, A. J., Mugo, D., Musyimi, R., Mutiso, A., Morpeth, S., Levin, M., & Scott, J. A. G. 2011. Performance of the MGIT TBc Identification Test and Meta-Analysis of MPT64 Assays for Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Liquid Culture. Journal of Clinical Microbiology, 49(12), 4343–4346. <http://doi.org/10.1128/JCM.05995-11>
 14. Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Cole, S. T. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99(6), 3684–3689. doi:10.1073/pnas.052548299
 15. Caceres O, Rastogi N, Bartra C, Couvin D, Galarza M, et al. 2014. Characterization of the Genetic Diversity of Extensively-Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from Pulmonary Tuberculosis Patients in Peru. PLoS ONE 9(12): e112789. doi:10.1371/journal.pone. 0112789.

16. CDC. 2009. Update Guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. *Morb Mortal Wkly Rep.* 58:7-10.
17. Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., *et al.* 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537-544
18. Cole, S.T. 1999. Learning from the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *FEBS Lett* 452:7-10.
19. Comas I, Homolka Susanne, Niemann Stefan, Gagneux Sebastien. 2009. Genotyping of Genetically Monomorphic Bacteria: DNA Serquencing in *Mycobacterium tuberculosis* Highlights the Limitations of Current Methodologies. *PLoS ONE*, 4(11):e7815.
20. Cousins DV. Skuce RA, Kazwala RR, van Embden JD. 1998. Towards a standardized approach to DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, Tuberculosis in Animals Subsection. *Int J Tuberc Lung Dis* 2: 471-78
21. Cox, R., and Mirkin, S.M. 1997. Characteristic enrichment of DNA repeats in different genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5237-5242.
22. Cox HS, Kubica T, Doshetov D, Kebede Y, Rusch-Gerdess S, *et al.* 2005. The Beijing genotype and drug resistant tuberculosis in the Aral Sea region of Central Asia. *Respir Res* 6: 134.
23. Dantas, N. G. T., Suffys, P. N., Carvalho, W. da S., Gomes, H. M., de Almeida, I. N., de Assis, L. J., ... de Miranda, S. S. (2015). Genetic diversity and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Minas Gerais State, Brazil. *BMC Infectious Diseases*, 15, 306. <http://doi.org/10.1186/s12879-015-1057-y>
24. Dinnes J, Deeks J, Kunst H, Gibson A, Cummins E, Waugh N, *et al.* 2007. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technol Assess.* 11:1-96

25. Domínguez J., Blanco S., Lacoma A., García-Sierra N., Prat C. y Ausina V. 2008. Utilidad de la biología molecular en el diagnóstico microbiológico de las infecciones por micobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 26 Supl 9:33-41
26. Fenner L, *et al.* 2012. Effect of mutation and genetic background on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:3047–3053
27. Gaafar A, Unzaga MJ, Cisterna R, Clavo FE, Urra E, Ayarza R and Martín G. 2003. Evaluation of a modified single-enzyme amplified fragment length polymorphism technique for fingerprinting and differentiating of *Mycobacterium kansasii* type I isolates. *J Clin Microbiol*, 41: 3846-3850
28. Gagneux S, *et al.* 2006. Impact of bacterial genetics on the transmission of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 2:e61 doi:10.1371/journal.ppat.0020061
29. García D. Mokrousov I., Rastogi N. 2011. Innovations in the molecular epidemiology of tuberculosis, *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 29(Supl 1): 8-13
30. Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, van Soolingen D. 2002. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis* 8: 843–849.
31. González-Martín, García J., Anibarro L., Vidal R., Esteban J., Blanquer R., Moreno S., Ruiz J. 2010. Documento consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. *Arch Bronconeumol*, 46(5): 255-274.
32. Goulding, J.N. Stanley, J., Saunders, N., Arnold, C., 2000. Genome-sequence-based fluorescent amplified- fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1121-1126.
33. González-Martin Julia. 2014. Microbiología de la tuberculosis. Seminarios de la Fundación Española de Reumatología, 15(1):25-33.
34. Groenen, P. M. A., A. E. Bunschoten, D. van Soolingen, and J. D. A. van Embden. 1993. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium*

- tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel method. Mol. Microbiol. 105:1057-1065.
35. Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre el Diagnóstico, el Tratamiento y la Prevención de la Tuberculosis. Centro Cochrane Iberoamericano, coordinador. Guía de Práctica Clínica sobre el Diagnóstico, el Tratamiento y la Prevención de la Tuberculosis. Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud del Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. Agència d'Informació, Avaluació i Qualitat en Salut (AIAQS) de Catalunya; 2009. Guías de Práctica Clínica en el SNS: AATRM Nº 2007/26.
 36. Herrera-León L, Pozuelo-Díaz R, Molina Moreno T, Valverde Cobacho A, Saiz Vega P, Jiménez Pajares MS. 2009. Aplicación de métodos moleculares para la identificación de las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 27(9):496-502
 37. Hermans, P. W., van Soolingen, D., and van Embden, J.D. 1992. Characterization of a major polymorphic tandem repeat in *Mycobacterium tuberculosis* and its potential use in the epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium gordonae*. J. Bacteriol 174:4157-4165.
 38. Higgins, C.F., Ferro-Luzzi Ames, G., Barnes, W.M., Clement, J-M., and Hofnung, M. 1982. A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. Nature 298: 760-762.
 39. Hood, D.W., Deadman, M.E. Jennings, M.P., Bisercic, M., Fleischmann, R.D., Venter, J.C., et al. 1996. DNA repeats identify novel virulence genes in Haemophilus influenza. Proc Natl Acad Sci USA 93:11121-11125.
 40. Hulton, C.S.J., Higgins, C.F., and Sharp, P.M. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *enterobacteria*. Mol Microbiol 5:825-834.
 41. Hunter PR and Gaston MA. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J. Clin Microbiol, 26: 2465-2466

42. Huys G, Rigouts L, Chemlal K, Portaels F and Swings J. 2000. Evaluation of amplified fragment length polymorphism analysis for inter- and intraspecific differentiation of *Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis*, and *Mycobacterium ulcerans*. *J Clin Microbiol*, 38: 3675–3680.
43. Huard RC, et al. 2006. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Bacteriol.* 188:4271–4287
44. Jafarian M., et. al. 2010. Synchronous Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* Epidemiology Strains by "MIRU-VNTR" and "MIRU-VNTR and Spoligotyping" Technique. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* 2(3): 145-152
45. Janssen P, Coopman R, Huys G, Swings J, Bleeker M, Vos P, Zabeau M and Kersters K. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiol*, 142: 1881–1893.
46. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A et al. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin Microbiol* 35:907-14.
47. Köser, C. U., Feuerriegel, S., Summers, D. K., Archer, J. A. C., & Niemann, S. 2012. Importance of the Genetic Diversity within the *Mycobacterium tuberculosis* Complex for the Development of Novel Antibiotics and Diagnostic Tests of Drug Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(12), 6080–6087. <http://doi.org/10.1128/AAC.01641-12>
48. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martin C. 1999. 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.* 37: 2607–2618.
49. Krishnan Manju Y, Indulakshmi R, Biljo V J, Madhavi Latha GK, Ajay Kumar R and Sathish Mundayoor. 2007. Combined use of Amplified Fragment Length Polymorphism and IS6110-RFLP in fingerprinting clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Kerala, South India. *BMC Infectious Diseases*, 7:86

-
50. Kurtoglu, M. G., Ozdemir, M., Kesli, R., & Baysal, B. 2014. Comparison of the GenoType® MTBC Molecular Genetic Assay with culture methods in the diagnosis of tuberculosis. *Archives of Medical Science: AMS*, 10(2), 315–318. <http://doi.org/10.5114/aoms.2012.29216>
51. Lawn SD, Zumla AI. 2011. Tuberculosis. *Lancet*. 378:57-72.
52. Lin, J.J., Kuo, J., 1995. AFLP: a novel PCR-based assay for plant and bacterial DNA finger-printing. *Focus*. 17, 66-70
53. Lozano José Antonio 2002. Tuberculosis. Patogenia, diagnóstico y tratamiento. OFFARM. Vol 21: 8 (102-110).
54. Machado, D., Ramos, J., Couto, I., Cadir, N., Narciso, I., Coelho, E., Viveiros, M. 2014. Assessment of the BD MGIT TBc Identification Test for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in a Network of Mycobacteriology Laboratories. *BioMed Research International*, 398108. <http://doi.org/10.1155/2014/398108>
55. Machado D., Ramos J., Couto I., *et al.*, 2014. "Assessment of the BD MGIT TBc Identification Test for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in a Network of Mycobacteriology Laboratories," *BioMed Research International*, Article ID 398108, 6 pages, 2014. doi:10.1155/2014/398108
56. Martin A, Bombeeck D, Fissette K, de Rijk P, Hernández-Neuta, Del Portillo P, Palomino JC. 2011. Evaluation of the BD MGIT TBc Identification Test (TBc ID), a rapid chromatographic immunoassay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex from liquid culture. *J Microbiol Methods*. Feb;84(2):255-7. doi: 10.1016/j.mimet.2010.12.003. Epub 2010 Dec 16.
57. Mizrahi, V., and Andersen, S.J. 1998. DNA repair in *Mycobacterium tuberculosis*. What have we learnt from the genome sequence? *Mol Microbiol* 29:1331-1339.
58. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. 2009. *Microbiología Médica*, 6ª ed. España: Elsevier Mosby.

59. Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M. *et al.* 1987. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235: 1616-1622.
60. Nakamura, Y., Carlson, M., Krapcho, K., Kanamori, M., and White, R. 1988. New approach for isolation of VNTR markers. *Am J Hum Genet* 43: 854-859.
61. Orcau A., Cayla Joan A. and Martínez José A. 2011. Present epidemiology of tuberculosis. Prevention and control programs. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 29(Supl 1): 2-7
62. Pang Y, Zhou Y, Zhao B, Liu G, Jiang G, *et al.* 2012. Spoligotyping and Drug Resistance Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Strains from National Survey in China. *PLoS ONE* 7(3): e32976. doi:10.1371/journal.pone.0032976
63. Parsons LM, Somoskovi A, Gutiérrez C, Lee E, Paramasivan CN, Abimuku A, *et al.* 2001. Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource poor countries: Challenges and opportunities. *Clin Microbiol Rev* 24:314-50.
64. Peak, I.R., Jennings, M.P., Hood, D.W., Bisercic, M., and Moxon, E.R. 1996. Tetrameric repeat units associated with virulence factor phase variation in *Haemophilus* also occur in *Neisseria* spp. And *Moraxella catarrhalis*. *Fems Microbiol Lett* 137:109-114.
65. Philipp WJ, Poulet S, Eiglmeier K, Pascopella L, Balasubramanian V, Heym B, Bergh S, Bloom BR, Jacobs Jr WR, Cole ST. 1996. An integrated map of the genome of the tubercle bacillus, *Mycobacterium tuberculosis* H37RRv, and comparison with *Mycobacterium leprae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:3132-3137.
66. Polet, S., and Cole, S.T. 1995. Characterization of the highly abundant polymorphic GC-rich-repetitive sequence (PGRS) present in *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Microbiol* 163: 87-95.
67. Ribeiro, S. C. M., Gomes, L. L., Amaral, E. P., Andrade, M. R. M., Almeida, F. M., Rezende, A. L., Lasunskaja, E. B. 2014. *Mycobacterium tuberculosis* Strains of the Modern Sublineage of the Beijing Family Are More Likely To Display Increased Virulence than Strains of the Ancient Sublineage. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(7), 2615–2624. <http://doi.org/10.1128/JCM.00498-14>

68. Richter E., Weizenegger M., Rusch-Gerdes S., Niemann S. 2003. Evaluation of Genotype MTBC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 41 (6): 2672-2675
69. Ritacco, Viviana, López, Beatriz, Cafrune, Patricia I, Ferrazoli, Lucilaine, Suffys, Philip N, Candia, Norma, Vásquez, Lucy, Realpe, Teresa, Fernández, Jorge, Lima, Karla V, Zurita, Jeannete, Robledo, Jaime, Rossetti, Maria L, Kritski, Afranio L, Telles, Maria A, Palomino, Juan C, Heersma, Herre, van Soolingen, Dick, Kremer, Kristin, & Barrera, Lucía. 2008. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype are rarely observed in tuberculosis patients in South America. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(5), 489-492.
70. Romero Gómez MP, Herrera-León L, Jiménez MS, García Rodríguez J. 2007. Comparison of GenoType® MTBC with RFLP-PCR and multiplex PCR to identify *Mycobacterium tuberculosis* complex species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26:63–66
71. Sartín Cerezales M., Domínguez J. 2011. Diagnosis of tuberculosis infection using interferón γ - based assays. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 29 Supl 1:26-33
72. Savelkoul PHM, Aarts HJM, De Haas J, Dijkshoorn L, Duim B, Otsen M, Rademaker JLW, Schouls L and Lenstra JA. 1999. Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an Art. *J Clin Microbiol*, 37: 3083-3091.
73. Sharples, G.J., and Lloyd, R.G. 1990. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosome. *Nucleic Acids Res* 18:6503-6508.
74. Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K.E., Connell, N.D., Kreiswirth, B.N., Whittam, T.S., *et al.* 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 9869-9874.
75. Stern, M.J., Ferro-Luzzi Ames, G., Smith, N.H., Robinson, E.C. and Higgins, C.J. 1984. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* 37:1015-1026.

-
76. Somoskovi A., Dormandy J., Rivenburg J., Pedrosa M., McBride Melinda y Salfinger M. 2008. Direct Comparison of the GenoType MTBC and Genomic Deletion Assays in Terms of Ability To Distinguish between Members of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Clinical Isolates and in Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 46: 1854 - 1857
77. Supply Philip, 2005. Multilocus Variable Number Tandem Repeat Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Technical Guide. Institut de Biologie/Institut Pasteur de Lille.
78. Supply Oh., *et. al.* 2006. Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 44:98-4510.
79. Supply P, Lesjean E, Savine K, Kremer K, van Soolingen D, and Locht C. 1997. Identification of novel intergenic repetitive units in a Mycobacterial two component system operon. *Mol. Microbiol* 26:991-1003.
80. Supply, P., Mazars, E., Lesjean, S., Vincent, V., Gicquel, B., and Locht, C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular Microbiology* 36(3), 762-771.
81. Tao Luo, Iñaki Comas, Dan Luo, Bing Lu, Jie Wu, Lanhai Wei, Chongguang Yang, Qingyun Liu, Mingyu Gan, Gang Sun, Xin Shen, Feiying Liu, Sebastien Gagneux, Jian Mei, Rushu Lan, Kanglin Wan, and Qian Gao. 2015. Southern East Asian origin and coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family with Han Chinese. *PNAS* 2015 112 (26) 8136-814. doi:10.1073/pnas.1424063112
82. Tautz, D., and Renz, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res* 12:4127-4138
83. Tautz, D., and Schlotterer, C. 1994. Simple sequences. *Curr Opin Genet Dev* 4: 832-837.
84. Tison F et Carbonnelle B. 1972. Recherche, isolement et étude du bacille tuberculeux et des autres mycobactéries en pratique courante. Crouan et Roques, Lille.

-
85. Thorne N, Evans JT, Smith EG, Hawkey PM, Gharbia S, Arnold C. 2007. An IS6110-targeting fluorescent amplified fragment length polymorphism alternative to IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium tuberculosis* DNA fingerprinting. *Clin Microbiol Infect.* 13: 964-70.
 86. Valsangiacomo C, Baggi F, Gaia V, Balmelli T, Peduzzi RA and Piffaretti JC. 1995. Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies. *J Clin Microbiol*, 33: 1716–1719.
 87. Van Embden J, Cave M, Crawford J, J.W. Dale, K. D. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, C. Martin, R. McAdam, T. M. Shinnick, and P.M. Small. 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.* 31: 406-9.
 88. Van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F, Qing HZ, Enkhsaikan D, Nymadawa P, van Embden JD. 1995. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol* 33(12):3234–3238.
 89. Van Soolingen D. 2001. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *Journal of Internal Medicine.* 249: 1-26
 90. Van Soolingen D, Hoogenboezem T, Den Haas PE, Hermans PW, Koedam MA, Teppema KS, *et al.* 1997. A novel pathogenic taxón of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: Characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol.* 47: 1236-45.
 91. Van Belkum, A., Scherer, S., van Leeuwen, W., Willemse, D., van Alphen, L., and Verbrugh, H. 1997. Variable number of tandem repeats in clinical strains of *Haemophilus influenzae*. *Infect.*
 92. Vanechoutte M. 1996. DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature. *Mol Biotechnol* 16: 115-142
 93. Viader-Salvadó J, Flores J, Vega A, Treviño V, Molina C, Vera L, Guerrero M. 2009. Simplified amplified-fragment length polymorphism method for genotyping

- Mycobacterium tuberculosis* isolates. Journal of Microbiological Methods 78: 331-338
94. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, de Lee TV, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M and Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res, 23: 4407–4414.
 95. Walker, T. M., Ip, C. L., Harrell, R. H., Evans, J. T., Kapatai, G., Dedicoat, M. J., Peto, T. E. 2013. Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. The Lancet Infectious Diseases, 13(2), 137–146. doi:10.1016/S1473-3099(12)70277-3
 96. Weiser, J.N., Love, J.M., and Moxon, E.R. 1989. The molecular mechanism of phase variation of H. influenza lipopolysaccharide. Cell 59:657-665.
 97. Weniger T., Krawczyk J., Supply P., Niemann S. and Harmsen D. 2010. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. Nucleic Acids Research 38, W326-W331.
 98. Willey J., Sherwood L., Woolverton Ch. 2011. Prescott's Microbiology. 8^a ed. Singapore: Mc Graw Hill.
 99. Woods GL, Fish G, Plaunt M, Murphy T. 1997. Clinical evaluation of DIFCO ESP culture System II for growth and detection of mycobacteria. J. Clin. Microbiol. 35:121-4.
 100. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2014. WHO 2014. Available: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
 101. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2015. WHO 2015. Available: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/