



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE TUBERCULOSIS
HUMANA EN EXTREMADURA**

JOSÉ MANUEL BENÍTEZ MEDINA

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

Conformidad de los Directores:

Fdo.: Dr. Javier Hermoso de Mendoza Salcedo

Fdo.: Dr. Alfredo García Sánchez

Fdo.: Dr. Jesús María Viñuelas Bayón

CÁCERES 2015

**A mis padres, por darme la vida;
a Inma, por compartir la suya conmigo y por darme
a Lucía, la razón de ser de nuestra vida.**

**«Yo, soy yo y mi circunstancia,
y si no la salvo a ella no me salvo yo»**

José Ortega y Gasset

Agradecimientos

Quisiera comenzar este apartado agradeciendo a la Consejería de Empleo, Empresa e Innovación de la Junta de Extremadura y al Fondo Social Europeo la financiación recibida para la realización de esta tesis doctoral a través de la «Ayuda para la formación predoctoral de personal investigador PRE08042», vinculada al proyecto de investigación PRIC060000142. Asimismo, quisiera agradecer a la Universidad de Extremadura la concesión del «Contrato Puente para Becarios Predoctorales (Acción III)» incluida en el Plan de Iniciación a la Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación de la Universidad de Extremadura del año 2012.

Por otro lado, la realización de esta tesis también ha sido posible gracias al proyecto de investigación, financiado por el Instituto de Salud Carlos III y el Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España (PS09/00513), titulado: «Tipificación molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis complex* aisladas en pacientes humanos y animales». A su vez, parte de este trabajo ha sido consecuencia de la participación en el proyecto de investigación, financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (INIA-MECFAU2006-00016), titulado: «Estudio de procesos bacterianos y parasitarios como modelos de interacción sanitaria de las poblaciones de jabalí con otros artiodáctilos silvestres»; así como por la participación en el convenio de colaboración (11N2999FD002) entre la Consejería de Industria, Energía y Medio Ambiente y la Consejería de Agricultura y Desarrollo Rural de la Junta de Extremadura y la Universidad de Extremadura para la «Propuesta y valoración de medidas a aplicar en zonas de especial incidencia de tuberculosis y estudio de la interacción de la fauna silvestre cinegética y doméstica».

Sin ese apoyo económico, este trabajo de investigación no hubiera resultado posible. Pero esta tesis tampoco sería lo que es, sin la ayuda, la colaboración, el consejo, el cariño, la reprimenda, la preocupación o el ánimo de todas las personas que han estado a mi lado durante estos años. Solo puedo decir que esta tesis es tan mía como vuestra, porque todos los que han pasado por esta situación saben que solo no se llega a este punto: tener la enorme satisfacción de agradeceros vuestro apoyo.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis tres directores: Javier Hermoso de Mendoza, Alfredo García y Jesús Viñuelas, por haberme dado la oportunidad de trabajar a su lado, de aprender de ellos y por haberme guiado durante esta apasionante travesía. Sin vosotros, este barco no hubiese llegado a buen puerto. Por ello, siempre os estaré agradecido.

También tengo que agradecerle mucho a mis compañeros de la Unidad de Patología Infecciosa. Ellos son los que me han acompañado durante muchas horas, y con los que he disfrutado tanto en el trabajo como fuera de él, convirtiéndose en verdaderos amigos. Muchas gracias a: Waldo, David, Remi, María Cortés, Pilar, María Gil, Eli, Belinda, Inés, Félix, Montaña, Sergio, Raquel. Por supuesto también a los profesores de la Unidad: Miguel, Joaquín, Juanma, Pedro y Rosario.

También me gustaría dar las gracias a los compañeros de otras Unidades de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura. A los compañeros de Genética, en especial a Juan Carlos y a Justi por su ayuda con el secuenciador. A los compañeros de Parasitología: Enrique, Eva, Pariente, Gamito, Rafa, Rubén y Román, con los que he compartido muchos momentos de coche cuando íbamos de monterías a tomar muestras. A Javi y Leti de Biología con los que también compartí jornadas post-cinegéticas.

Mi más sincero agradecimiento al personal del Hospital San Pedro de Alcántara por acogerme como uno más: a Candy por su ayuda en el laboratorio, a Rocío y Magda por su ayuda con la revisión de las historias clínicas.

Me gustaría también dar las gracias al personal Servicio de Sanidad Animal, representados por Cristina Sanz, por mostrarse siempre dispuestos a colaborar con nosotros facilitándonos cualquier información. Mi más sincero agradecimiento también a todos los veterinarios, tanto de las OVZ de Extremadura como inspectores del SES, que han participado en los muestreos, en especial a Ángel Tato y a José Antonio Abecia, por su disposición en todo momento a colaborar con nosotros.

Gracias a Lucía de Juan de VISAVET y a Darío García de Viedma del Hospital Gregorio Marañón por facilitarnos ADN de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv.

Sin dejar el lado laboral, aunque entrando ya en el plano más personal, quiero agradecer a Julián Monforte y a M^a José Elviro que me diesen la oportunidad de trabajar como formador y poder resistir hasta que llegó la ansiada beca. Muchas gracias a sus respectivos, que además de paisanos son amigos, José Francisco y M^a Félix, que con su ejemplo e insistencia en los momentos más duros he podido acabar la tesis. Por acabar con la familia, muchas gracias también a Ladi, que no faltaba ocasión en la que me recordase que para cuando la lectura, y por supuesto a la mayor de la familia, Isabel, y a los peques, o no tan peques: José, M^a Félix, Julia Isabel, Isabel y Pepe. Gracias también a los amiguitos de Cáceres, a los de Monterrubio y los de Málaga.

Gracias también a los compañeros de facultad y amigos: Sheila, Fidel, de los que he aprendido a valorar la vida, Luís, Pallares, Santi, Antonio Luís, Pecero, Samu; con ellos empecé y sería injusto no mencionarlos.

Gracias a Pedro Sánchez Algaba y a su familia, en la que incluyo a Antonio, por acogerme como a un miembro más de su familia. Tampoco son familia pero como si lo fueran, a Pedro y María (sin olvidar a Pedro Jr.).

Y en ese punto entre la amistad y la familia está Jesús, que es como un hermano para mí, muchas gracias por todo. Gracias a mis dos hermanas y mis cuñados, por ser parte de mi vida. Aunque ellos no sepan muy bien lo que estoy haciendo pero quiero mencionar a mi sobrino Daniel, a mi tía Paqui y a mi abuela (también me quiero acordar de mis otros abuelos que ya no están aquí pero que donde quiera que estén seguro que se alegrarán) que me motivan a seguir adelante. Por supuesto, muchísimas gracias a mis padres, me lo han dado todo y espero poder devolvérselo algún día. También quiero agradecer su constante preocupación a mis suegros, Pepe y Esperanza, y a mi cuñado José Domingo. Y por supuesto, a la persona que comparte mi vida y que está a punto de darme lo más maravilloso que nos va a pasar, nuestra hija Lucía. Muchas gracias por tu amor.

A todos, ¡gracias!

Índice

Agradecimientos	i
Índice	v
Introducción.....	1
Objetivos y organización de la tesis	3
Parte I Revisión bibliográfica	5
1. Pasado, presente y futuro de la tuberculosis	7
1.1. Historia de la enfermedad	7
1.2. Situación actual de la tuberculosis	23
1.3. Futuro: esperanzador, pero lleno de retos e incertidumbres.....	29
2. Género <i>Mycobacterium</i>	33
2.1. Taxonomía de las micobacterias	34
2.2. Envoltura celular	39
3. Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	43
4. Origen y difusión de la tuberculosis humana.....	49
5. Patogénesis de la tuberculosis.....	53
5.1. Beneficios biológicos del granuloma tuberculoso	57
5.2. Necrosis, licuefacción y cavitación: claves en la persistencia y transmisión del bacilo tuberculoso	61
6. «Tuberculosis latente»: un desafío persistente	67
6.1. Latencia, inactividad, quiescencia, reposo o persistencia: terminología profusa, enigma irresuelto.....	68
7. Manifestaciones clínicas de la enfermedad activa	73
7.1. Determinantes del fenotipo clínico	76
8. Caracterización molecular del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	81
8.1. Análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción	83
8.2. Identificación de la IS6110 mediante reacción en cadena de la polimerasa	87
8.3. Espoligotipado.....	88
8.4. Análisis del número variable de repeticiones en tándem de múltiples <i>loci</i>	95
8.5. Electroforesis en campo pulsante.....	102
8.6. Análisis de deleciones	104
8.7. Análisis de polimorfismos de un solo nucleótido	105
8.8. Secuenciación completa del genoma.....	107
9. La epidemiología molecular como fuente del conocimiento	111
9.1. Transmisión reciente	112
9.2. Tuberculosis recurrente: ¿recidiva o reinfección?	116
9.3. Infecciones mixtas.....	118
9.4. Detección de contaminación cruzada.....	121
9.5. Cuestiones abiertas	122
Parte II Diversidad genética de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en Extremadura, España: un estudio retrospectivo (1998-2012)	125
10. Determinación de la estructura poblacional de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en Extremadura basada en el espoligotipado	127
11. Utilidad del MLVA para el genotipado de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en Extremadura	153

12. Uso combinado del MLVA y el espoligotipado para el estudio de la diversidad genética de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	173
Parte III Epidemiología molecular de la tuberculosis humana en Extremadura	185
13. Factores asociados con la agrupación de casos de tuberculosis en Extremadura	187
14. Complejidad clonal en la infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	211
Parte IV Análisis molecular de aislados de <i>Mycobacterium bovis</i>	219
15. Tuberculosis humana causada por <i>Mycobacterium bovis</i> en Extremadura	221
16. Comparación de aislados humanos y animales de <i>Mycobacterium bovis</i> con idéntico espoligotipo	227
Conclusiones.....	243
Resumen	245
Lista de abreviaturas	249
Lista de figuras	251
Lista de tablas	252
Bibliografía.....	253

Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa tenaz y persistente que ha afectado a las poblaciones humanas durante miles de años. La TB, que se ha descrito como la «enfermedad de la familia por excelencia» y ha ido pasando de generación en generación, continúa siendo un importante problema de Salud Pública. En la actualidad, esta pandemia mundial afecta principalmente a países en vías de desarrollo, aunque los movimientos migratorios han provocado un incremento de las tasas de enfermedad en muchos países industrializados. Además, las características patogénicas de la TB favorecen la existencia de un gran reservorio humano, lo cual contribuirá a que la enfermedad se mantenga entre nosotros durante décadas.

Las conexiones entre la Salud Pública, la Medicina Veterinaria y la Sanidad Animal fueron objeto de investigación ya en la Europa del siglo XIX. Varios experimentos, llevados a cabo por veterinarios, indicaron que la TB bovina era contagiosa y podía ser transmitida a los seres humanos. En aquel entonces, los primeros intentos por establecer programas de control de la TB bovina no estuvieron exentos de polémica, generándose un intenso debate entre los profesionales que se mostraban a favor, por los beneficios sanitarios, y los que se posicionaban en contra de su implantación, por las pérdidas económicas que ocasionaban. Algunos científicos creían incluso que los seres humanos eran inmunes a la infección causada por el agente etiológico de la TB bovina y, por lo tanto, no representaba ninguna amenaza para las personas; considerándose que era innecesario intentar controlar la enfermedad en el ganado, así como aplicar medidas para reducir el riesgo de infección. Al final

admitieron, aunque sin demasiada vehemencia, que el contagio de la TB bovina a las personas podía ocurrir. Actualmente, en los países desarrollados, estos programas de control y erradicación, junto con la pasteurización de los productos lácteos y la inspección de la carne en los mataderos, han reducido considerablemente la incidencia de la enfermedad tanto en el ganado como en los seres humanos.

Motivados por una inquietud similar a la de aquellos investigadores, nos planteamos realizar un estudio con el propósito de determinar la influencia de esta zoonosis en la epidemiología de la TB humana en Extremadura; intentando establecer posibles conexiones entre los animales (domésticos y salvajes) y la población extremeña. Además, teniendo en cuenta que la información existente en nuestra región sobre la enfermedad en el ser humano es escasa, creímos conveniente no limitar nuestro estudio a aclarar solo los aspectos zoonóticos, sino que era necesario llevar a cabo una investigación más completa.

Para ello, en este trabajo, desarrollado a partir de la colaboración entre el Laboratorio de Microbiología del Complejo Hospitalario de Cáceres (Servicio Extremeño de Salud) y el Laboratorio de Micobacterias del Departamento de Sanidad Animal (Universidad de Extremadura), se ha analizado una colección de aislados clínicos de pacientes con TB. En el análisis se han empleado técnicas de caracterización molecular, pues la aplicación de estrategias de genotipado al estudio de la TB ha sido esencial para aclarar cuestiones claves sobre esta enfermedad, al tiempo que ha permitido apoyar el desarrollo y la aplicación de medidas de control más eficaces.

En definitiva, con este estudio pretendemos, gracias a la cooperación entre médicos y veterinarios, seguir avanzando en la complicada tarea de erradicar una enfermedad que llevamos padeciendo durante milenios.

Objetivos y organización de la tesis

El objetivo global de esta tesis doctoral es el estudio epidemiológico de la TB humana en Extremadura, mediante la caracterización molecular de una colección de aislados clínicos y la complementación del análisis genotípico con información sociodemográfica, clínica y microbiológica; todo ello para un mejor entendimiento de la epidemiología de la enfermedad en Extremadura, incluyendo también los aspectos zoonóticos de la misma. Los objetivos específicos de la investigación son:

1. Conocer la diversidad genética del agente causal de la TB humana en Extremadura mediante el uso de técnicas de genotipado.
2. Estudiar el grado de transmisión reciente de la enfermedad en la población extremeña e identificar los factores de riesgo asociados con la agrupación de casos de TB en nuestra área.
3. Establecer si entre los extranjeros la enfermedad se ha producido por reactivación endógena o por infección reciente para conocer la influencia de la población inmigrante en la epidemiología de la TB en Extremadura.
4. Estudiar la complejidad clonal de la TB en un entorno de baja incidencia de enfermedad.
5. Determinar la influencia zoonótica de la TB bovina en nuestra región.
6. Identificar el origen de la zoonosis.

Con la intención de conseguir un trabajo didáctico en el que quedasen reflejadas las dificultades que presenta el estudio de esta enfermedad y que en cierto modo, se han ido superando conforme han ido apareciendo nuevos avances, la tesis se ha estructurado en cuatro partes:

Parte I. Revisión bibliográfica: Son numerosas las investigaciones que se han llevado a cabo en torno a la TB, y su interés continúa creciendo. A pesar de este esfuerzo, queda aún mucho por hacer, y no menos que contar. Por tanto, en este trabajo de revisión se intenta recopilar toda la información posible que permita entender mejor los estudios que se presentan a continuación.

Parte II. Diversidad genética de *Mycobacterium tuberculosis* en Extremadura, España: un estudio retrospectivo (1998-2012): En esta parte, primero se realiza un análisis por separado con cada una de las dos técnicas de caracterización molecular que se utilizan en la investigación para posteriormente combinarlas con el fin de ampliar nuestros conocimientos sobre las cepas del agente estiológico de la TB humana que están presentes en esta región.

Parte III. Epidemiología molecular de la tuberculosis humana en Extremadura: Una vez realizado el análisis genético de las cepas, se pretendió dar mayor aplicabilidad al uso de esas técnicas, complementándolas con la oportuna información clínica y epidemiológica para conocer más aspectos relacionados con la distribución de la enfermedad en la población extremeña.

Parte IV. Análisis molecular de aislados de *Mycobacterium bovis*: En esta última parte, el protagonista es el agente causal de la TB bovina y se ha seguido con la misma metodología con el propósito de conocer los determinantes zoonóticos de este proceso en Extremadura.

Parte I

Revisión bibliográfica

“You have to know the past to understand the present”

(«Hay que conocer el pasado para comprender el presente»)

Dr. Carl Sagan (1934–1996)

1. Pasado, presente y futuro de la tuberculosis

1.1. Historia de la enfermedad

La TB es una enfermedad que ha acompañado al ser humano desde tiempos prehistóricos, como demuestran las evidencias arqueológicas encontradas con la presencia de lesiones características en esqueletos humanos con miles de años de antigüedad (Holloway *et al.*, 2011). En este sentido, la TB ha sido reconocida por las típicas deformaciones óseas que se producen principalmente en la columna vertebral¹ (Roberts y Buikstra, 2003). La presencia de lesiones reactivas en el periostio de los huesos tubulares (osteoartropatía hipertrófica) y la osteomielitis son indicios también de enfermedad tuberculosa (Ortner y Putschar, 1981). A su vez, la calcificación de la pleura se ha considerado un signo casi patognomónico de esta afección, al no existir otros procesos patológicos en los que comúnmente aparezcan adherencias pleurales (Donoghue *et al.*, 1998; Lombardi y Cáceres, 2000). Por lo tanto, gracias a las señales indelebles que la TB ha dejado en ciertos tejidos, especialmente en los huesos, la paleopatología² ha hecho posible que se pueda demostrar que nuestros más remotos antepasados ya padecían esta enfermedad (Maradona, 2009). Así, la evidencia conocida más antigua de TB en un fósil humano, aunque discutida por aportar pruebas insuficientes (Roberts *et al.*, 2009), data del Pleistoceno Medio, hace aproximadamente 500000 años. Corresponde al cráneo de un *Homo erectus*, cuyos restos fósiles se encontraron en Turquía y del que se sospecha que padeció una meningitis tuberculosa (Kappelman *et al.*, 2008).

¹ La infección tuberculosa vertebral debe su nombre a Percivall Pott (1714-1788). El mal de Pott o espondilodiscitis tuberculosa, constituye la localización más frecuente de la infección tuberculosa del aparato locomotor (Herrera *et al.*, 1998).

² Ciencia que estudia las huellas dejadas por la enfermedad en los restos de seres vivos, entre ellos el hombre.

Sin embargo, la mayoría de estas lesiones óseas también pueden ser causadas por otros procesos patológicos; y por consiguiente, solo con la evidencia esquelética puede resultar insuficiente para emitir un diagnóstico fiable. Por ello, la incorporación de las técnicas de biología molecular para la detección de micobacterias tuberculosas en huesos antiguos (Spigelman y Lemma, 1993) y tejido momificado (Salo *et al.*, 1994), ha dado origen a una nueva disciplina científica que recibe el nombre de paleomicrobiología³, y ha permitido la confirmación de las sospechas paleopatológicas a través del estudio de ADN antiguo (Taylor *et al.*, 2010) y otros marcadores biológicos (Tran *et al.*, 2011) del bacilo tuberculoso (Donoghue, 2011).

De este modo, el caso más antiguo de TB humana confirmado hasta el momento se ha encontrado en Atlit-Yam (Haifa, Israel). Los esqueletos analizados corresponden a una mujer y un niño, probablemente su hijo, que vivieron en un asentamiento del Neolítico Precerámico hace unos 9000 años. Estos restos óseos representan la muestra más antigua de ADN del bacilo tuberculoso en seres humanos (HersHKovitz *et al.*, 2008). Además, este es uno de los primeros yacimientos donde existen abundantes evidencias arqueológicas de actividad agrícola y domesticación de animales, y es el único asentamiento neolítico en el que se ha encontrado una gran cantidad de huesos de bóvidos. Esto indica que el ganado era un importante componente en la dieta y en la vida de nuestros ancestros (Galili *et al.*, 2002). No obstante, y en contra de lo que se creía inicialmente, es probable que el ganado no representara una fuente primaria de infección para el hombre; aunque sí pudo facilitar que hubiese una población humana más numerosa y densa (Wolfe *et al.*, 2007). Este hecho pudo favorecer, a su vez, el mantenimiento y la transmisión del bacilo de la TB entre los seres humanos (Weiss y McMichael, 2004).

³ Campo emergente de la investigación en microbiología que se dedica a la detección, identificación y caracterización de microorganismos en muestras antiguas (Drancourt y Raoult, 2005).

De igual forma se han encontrado pruebas suficientes que demostrarían la existencia de la enfermedad en Europa desde hace unos 7000 años (Nicklisch *et al.*, 2012; Masson *et al.*, 2013). Los casos más antiguos confirmados mediante el estudio de ADN antiguo datan del Neolítico Temprano (5400-4800 a. C.) y se han hallado en tres sitios (Halberstadt, Derenburg y Karsdorf) de la región alemana de Sajonia-Anhalt (Nicklisch *et al.*, 2012). También a esa época pertenece un esqueleto humano, encontrado en el asentamiento neolítico de Hódmezővásárhely-Gorzsa (Hungría), en el que se ha confirmado la presencia de micobacterias mediante análisis biomoleculares (Masson *et al.*, 2013). Asimismo, se han evidenciado lesiones características en esqueletos de seres humanos que vivieron en el último período de la Edad de Piedra en otros países europeos (Stone *et al.*, 2009), como los restos óseos con espondilitis tuberculosa descubiertos en la cueva de Arene Candide (Liguria, Italia) que tienen unos 6000 años de antigüedad (Formicola *et al.*, 1987; Canci *et al.*, 1996). También en Italia, en el yacimiento prehistórico de Corvaro (Rieti), se ha hallado parte del esqueleto de un varón con «mal de Pott» que vivió en la Edad de Hierro (Rubini *et al.*, 2014). El ejemplo más antiguo revelado en Inglaterra (Tarrant Hinton, Dorset) procede igualmente de la Edad de Hierro, hace aproximadamente 2200 años (Mays y Taylor, 2003), y ha sido uno de los pocos casos en ser probado por métodos moleculares (Taylor *et al.*, 2005).

Se tiene constancia también de que la TB estaba presente y era frecuente en el antiguo Egipto desde períodos muy tempranos⁴ (Zink *et al.*, 2003a), al haberse identificado ADN del bacilo de la TB en la columna vertebral y costillas de momias de la época que presentaban lesiones compatibles con la enfermedad (Nerlich *et al.*, 1997; Zink *et al.*, 2003b).

⁴ Existen abundantes restos arqueológicos que muestran la importancia de la TB ya en el Egipto Predinástico de hace más de 5400 años (Crubézy *et al.*, 1998).

Por otra parte, en los últimos años se han publicado numerosos escritos que documentan la presencia de TB en pobladores americanos antes del contacto con los europeos (Darling y Donoghue, 2014). Pese a ello, el origen de la TB precolombina sigue siendo una incógnita (Wilbur y Buikstra, 2006). Actualmente, la hipótesis más aceptada es que la enfermedad habría llegado al continente americano con las migraciones, humanas (Daniel, 2000) o animales (Rothschild *et al.*, 2001; Rothschild y Martin, 2006), que desde Asia cruzaron el puente terrestre de Bering hace más de 10000 años (Mackowiak *et al.*, 2005). La TB habría persistido de forma endémica en algunos de los pequeños grupos nómadas dispersos por América, para posteriormente alcanzar niveles epidémicos con el establecimiento de comunidades sedentarias densamente pobladas (Daniel, 2000; Gómez i Prat y Mendonça de Souza, 2003; Mackowiak *et al.*, 2005). Factores como la introducción de nuevas cepas procedentes de Europa o los determinantes socioculturales, explicarían el terrible impacto de la TB entre los indígenas de América a pesar de la antigüedad de esta afección en aquel continente (Daniel, 2000; Wilbur y Buikstra, 2006). Sin embargo, puede que el puente de Bering no fuese la única vía de entrada de la enfermedad en el continente americano. Los autores de un reciente estudio, en el que se ha identificado ADN micobacteriano en restos óseos de seres humanos procedentes de un yacimiento arqueológico (Chiribaya Alta) situado en una zona próxima a la costa del sudoeste de Perú, han sugerido que los mamíferos marinos podrían haber desempeñado un papel relevante en la propagación de la TB desde África, a través del Océano Atlántico, hacia el Nuevo Mundo (Bos *et al.*, 2014). La posibilidad de que los mamíferos marinos transmitieran la enfermedad a los grupos de cazadores-recolectores de Suramérica ya había sido contemplada (Bastida *et al.*, 2011), por lo que este descubrimiento confirmaría esas sospechas. En cualquier caso, a pesar de que su origen sea aún incierto, los estudios paleomicrobiológicos han

demostrado que la enfermedad existió en las sociedades precolombinas de América del Sur (Salo *et al.*, 1994; Arriaza *et al.*, 1995; Konomi *et al.*, 2002; Sotomayor *et al.*, 2004; Klaus *et al.*, 2010; Bos *et al.*, 2014) y Norteamérica (Braun *et al.*, 1998).

No solo las evidencias arqueológicas encontradas nos dan muestra de la antigüedad de esta enfermedad, sino que también existen testimonios escritos pertenecientes a la Edad Antigua que se corresponden aceptablemente con cuadros clínicos atribuibles a la TB (Maradona, 2009).

Aunque probablemente se había descrito ya en los textos indios, las primeras referencias claras a TB pulmonar datan de los tiempos de Hipócrates (460-370 a. C.); conociéndose como «tisis», término que procede del latín *phthīsis*, y este del griego φθίσις, que indica enfermedad consuntiva (Bloom y Murray, 1992). Hipócrates, el más famoso de los médicos griegos, realizó descripciones detalladas de la tisis. En una de ellas, recogida en el *Libro III sobre las epidemias* de los escritos hipocráticos, la destacó como «la enfermedad más extendida, la más difícil y la que se llevó a más gente». Las manifestaciones clínicas descritas son perfectamente compatibles con la TB pulmonar. No obstante, la escuela hipocrática consideraba que la tisis pulmonar era una enfermedad hereditaria, en lugar de infecciosa (Herzog, 1998). Fue Aristóteles (384-322 a. C.) quien sugirió la naturaleza contagiosa de la enfermedad (Al-Amoud, 1993); opinión mantenida también por Galeno (131-201 d. C.), uno de los médicos más importantes de la época romana, quien describió un cuadro clínico de ulceración pulmonar que cursaba la mayoría de las veces con hemoptisis, dolor torácico, tos, expectoración y fiebre; para el que recomendó reposo y dieta. Asimismo, señaló ciertas lesiones de la columna vertebral que podrían corresponder con una TB espinal (Marketos y Skiadas, 1999).

Durante la Edad Media no se avanzó demasiado en el conocimiento de esta dolencia. Posiblemente lo más significativo fue la difusión del término «escrófula» para la adenitis tuberculosa. La palabra escrófula proviene del latín *scrofa* (cerda) y asocia la imagen del ancho cuello que posee este animal con el también ancho cuello que, debido a las inflamaciones ganglionares, tienen los pacientes con TB ganglionar cervical (Maradona, 2009). Durante esta época fue creencia en Francia e Inglaterra que sus respectivos reyes tenían un poder sobrenatural para curar la escrófula o «mal del rey» (Bloom y Murray, 1992); facultad que ejercían mediante el «toque real» (Grzybowski y Allen, 1995), y que consistía en la imposición de la mano del monarca sobre el enfermo mientras pronunciaba las palabras rituales: «El rey te toca, Dios te cura».

Coincidiendo con la llegada del Renacimiento y la Edad Moderna la medicina experimentó una nueva orientación. Quizás el hecho más importante a recordar de entre los que en el siglo XVI atañen a la tisis es la teoría sobre la génesis de la afección pulmonar de Fracastoro (1478-1553). Este médico y humanista fue capaz de elaborar una hipótesis muy cercana a la realidad sobre la transmisión y el origen de la TB, en un tiempo en que no se disponía de ninguna evidencia acerca de la existencia de organismos microscópicos. Aunque sus pensamientos no eran originales, ya que siempre hubo en los siglos precedentes alguien que apuntaba la posibilidad del contagio entre personas, sí tuvo el mérito de elaborarlos de una manera que se aproximó enormemente a la realidad y de explicarlos con claridad. Fracastoro estableció una doctrina del contagio cuyos agentes eran los *seminaria*, organismos, que él no creyó que fuesen seres vivos, cuyo origen estaba en los humores corrompidos de los enfermos contagiosos o también en el aire, y que eran susceptibles de alcanzar esa cualidad por la acción de diversos agentes físicos o de otra naturaleza (Maradona, 2009).

Por otro lado, la ausencia de unas estadísticas fiables nos ha impedido disponer de datos de confianza sobre las características de la endemia de tisis en los siglos XVII y XVIII. A pesar de ello, sí ha sido posible conocer que durante el transcurso del siglo XVII la enfermedad experimentó un aumento en su extensión. La gran epidemia europea conocida como «Peste Blanca», se inició probablemente en el siglo XVII y continuó durante los siguientes 200 años⁵. Se ha estimado que en algunos países europeos la TB podría haber causado entre una cuarta parte y cerca de la mitad de todas las defunciones hacia el final del siglo XVII y el comienzo del XVIII (Bello *et al.*, 2000). En Londres, en 1651, la TB era responsable de un 20 % del total de muertes, alcanzando tasas de 700 casos por cada 100000 personas en 1801 (Bloom y Murray, 1992).

Desde el punto de vista del desarrollo científico asistimos en estos siglos al comienzo de una época trascendental, pues comenzaron a darse los primeros pasos que permitieron penetrar en la naturaleza de la enfermedad (Daniel, 2006). Los siguientes avances en el estudio de la tisis están asociados a la práctica de autopsias y la descripción anatomopatológica del proceso. En su *Opera Medica* de 1679, Sylvius (1614-1672) fue el primero en usar el término «tubérculo» para referirse a las lesiones constantes y características que aparecían en los pulmones y otros órganos de los tísicos (Herzog, 1998). Su gran perspicacia le condujo a asociar la clínica con los hallazgos patológicos descubiertos en varios tejidos durante las autopsias. La explicación que dio sobre la enfermedad proporcionó un nuevo panorama y sentó las bases para las grandes aportaciones de los siglos posteriores.

Las observaciones microscópicas de finales del siglo XVII y el consiguiente descubrimiento de organismos imperceptibles a simple vista, propiciaron que algunos

⁵ La revolución industrial motivó que muchas personas emigraran desde las zonas rurales a las grandes urbes europeas; esto, añadido a las condiciones de hacinamiento en las que vivían, la falta de higiene y la malnutrición, incrementaron tanto la propagación como la susceptibilidad de la población a la enfermedad (Cole *et al.*, 1998; Daniel, 2006).

especularan con la hipótesis de que estos seres microscópicos podrían causar enfermedades. Uno de ellos fue Benjamin Marten (1704-1722) quien en 1720, en su libro titulado *A new theory of consumptions: more especially of a phthisis or consumption of the lungs*, dio a conocer una nueva teoría sobre la causa de la tisis, formulando la primera especulación creíble del carácter infeccioso de la enfermedad. En ella reivindicaba la acción de unas «diminutas criaturas vivientes», a las que llamó *animalcula* (animáculo), que se transmitían a través de la respiración de los enfermos (Doetsch, 1978).

En el primer tercio de siglo XIX destaca sobre el resto de figuras médicas René Laënnec (1781-1826), inventor del estetoscopio, pero cuya contribución en los terrenos de la anatomía patológica y de la clínica es de una importancia superior (Maradona, 2009). Laënnec aplicó a la tisis la técnica auscultatoria y la de la percusión, y correlacionó los signos que hallaba en sus exploraciones con las lesiones del pulmón que descubría en las autopsias. De esta manera pudo establecer una asociación entre las manifestaciones clínicas y las alteraciones patológicas correspondientes, y mejorar el conocimiento secuencial del proceso patológico. A su vez, introdujo términos para describir sus hallazgos que todavía están en uso, como estertores, soplos, etc., pudiéndose afirmar, por lo tanto, que la comprensión moderna de esta enfermedad comenzó con los trabajos de Laënnec (Daniel, 2006).

Por su parte, el término «tuberculosis» lo sugirió en 1839 Johann Lukas Schönlein (1793-1864), adaptándolo de la palabra tubérculo (Ferlinz, 1995), para englobar todas aquellas manifestaciones de la enfermedad en las que el tubérculo estuviera presente.

Otro aspecto importante en el conocimiento de la TB fue el notable progreso que se experimentó en el campo de la epidemiología durante la segunda mitad del siglo XIX.

Así, la primera afirmación apoyando con cierta fuerza la creencia del contagio de la TB proviene de Philipp Klenke (1813-1881), quien en 1843 sostuvo que la enfermedad podía ser transmitida a partir del tejido tuberculoso (Gradmann, 2001). Jean-Antoine Villemin (1827-1892) demostró experimentalmente dicha transmisión, inoculando pus y fluidos de lesiones humanas a conejos, que desarrollaban la enfermedad. De este modo, llegó a la conclusión de que se trataba de una «infección específica y su causa un agente inoculable» (Villemin, 1865). Los trabajos de Villemin sobre la naturaleza contagiosa de la TB crearon gran controversia, al fracasar otros investigadores en sus inoculaciones, hasta que Julius Friedrich Cohnheim (1839-1884) y Carl Julius Salomonsen (1847-1924) consiguieron reproducir sus experimentos (Cohnheim y Salomonsen, 1877), al inocular material tuberculoso en la cámara anterior del ojo de animales y contribuyendo de esta forma a establecer el carácter infeccioso de la TB.

Sin embargo, aún no se había encontrado el agente etiológico. Muy cerca de lograrlo se quedó Edwin Klebs (1834-1913), que fue el primero en avanzar en 1877 la teoría de que el agente causal de la TB podría ser una bacteria (Gradmann, 2001), aunque no pudo reconocer la verdadera naturaleza del microorganismo (Herzog, 1998).

La historia de esta enfermedad cambió drásticamente en 1882 cuando Robert Koch (1843-1910) anunció, en una reunión mensual de la «Sociedad Fisiológica de Berlín», que había logrado identificar y cultivar el agente etiológico de la TB: una bacteria en forma de bastoncillo a la que llamó «bacilo de la TB» (Barnes, 2000). La presentación pública de su descubrimiento tuvo lugar el día 24 de marzo⁶, en una conferencia titulada «Acerca de la TB» (Murray, 2004b). 17 días después, el 10 de abril de 1882, Koch publicó su estudio (Sakula, 1982), bajo el título «La etiología de la TB» (Koch, 1882), en el que establecía de manera inequívoca una relación de causa y efecto

⁶ Fecha posteriormente declarada «día mundial de la TB» para conmemorar la importancia de este hecho.

entre el bacilo y la enfermedad (Barnes, 2000), responsable de una de cada siete muertes en Europa en ese momento (Daniel, 2005). A su vez, fijó los criterios, adaptados a los de su maestro Jakob Henle (1809-1885), que necesariamente deben cumplirse para poder responsabilizar a un determinado microorganismo como causante de una infección. Estas condiciones han permanecido en uso hasta la actualidad y se denominan comúnmente «postulados de Koch» (Daniel, 2005).

Los primeros intentos de encontrar un tratamiento efectivo para la TB los realizó el propio Koch, al anunciar en 1890 que un extracto con glicerol del bacilo tuberculoso, inicialmente llamado «linfa de Koch» y que posteriormente se denominó «tuberculina», tenía propiedades terapéuticas (Kaufmann, 2003). Esta conclusión fue rápidamente refutada por ensayos clínicos que mostraron la falta de eficacia del tratamiento (Kaufmann y Schaible, 2005). No obstante, Koch pronto se dio cuenta del potencial diagnóstico de esta sustancia (Kaufmann, 2003); aunque su mecanismo de acción no comenzó a ser explicado hasta que Clemens von Pirquet (1874-1929) realizó varios trabajos, entre 1903 y 1907, sobre inmunidad e hipersensibilidad. Estas valiosas y originales investigaciones contribuyeron al desarrollo de un nuevo campo de conocimiento que él denominó «alergia». Así, en 1907, después de enterarse de que la linfa de Koch producía reacciones en personas tuberculosas, introdujo una prueba dérmica con la tuberculina, consistente en la aplicación de una pequeña cantidad de esta sustancia sobre una zona de piel escarificada. Para ello utilizó una lanceta de vacunación y estimó en cinco milímetros el límite mínimo de induración cutánea para calificar como positiva la reacción, acertando plenamente en la interpretación de los resultados (Maradona, 2009). Además, von Pirquet señaló que las reacciones positivas de tuberculina en los niños que no presentaban manifestaciones clínicas se correspondían con casos de «TB latente», término que él acuñó (Daniel, 2006).

En 1908, la búsqueda de una forma de inoculación que no produjera una fuerte reacción general, propició que se introdujera la intradermorreacción de Mantoux. Prueba en la que una cantidad de tuberculina medida con precisión se inyecta a una profundidad conocida, permitiendo una mayor certeza en el diagnóstico, así como la posibilidad de comparar los resultados obtenidos en pruebas sucesivas. Con el objetivo de disminuir las reacciones no específicas asociadas a la anterior, la tuberculina antigua fue sustituida por un derivado proteico purificado (PPD), desarrollado por Florence Seibert (1897-1991) en una serie de investigaciones en el *Phipps Institute* de la Universidad de Pensilvania durante la década de 1930 (Daniel, 2006).

Otra contribución igualmente importante para el diagnóstico de la TB fue el descubrimiento de los rayos X en 1895 por Wilhelm Konrad von Röntgen (1845-1923). Este revolucionario avance en el campo de la física se empezó a utilizar en el diagnóstico de los casos de TB dudosos, relacionándose los signos radiográficos con los encontrados en la exploración física (Herzog, 1998). Progresivamente, su uso se extendió a todos los sanatorios antituberculosos; lo cual, unido a la generalización de estos lugares como base del tratamiento en la segunda mitad del siglo XIX, gracias al médico alemán Hermann Brehmer⁷, contribuyó a que la incidencia de la enfermedad y su mortalidad empezasen a bajar antes de la aparición de la vacuna y los primeros fármacos eficaces.

El fracaso terapéutico de la tuberculina y el éxito alcanzado en otras enfermedades, provocó que las investigaciones para combatir la enfermedad se decantaran por la búsqueda de vacunas. De este modo, a principios del siglo XX, los franceses Albert Calmette (1863-1933) y Jean-Marie Camille Guérin (1872-1961) fueron capaces de demostrar que después de 231 pases seriados (entre 1908 y 1924), en

⁷ Hermann Brehmer (1826-1889) propuso que la TB, en su fase inicial, se curaba sola si se llevaba a los enfermos a un «lugar inmune» donde no hubiera tísicos.

un medio de cultivo que contenía caldo de patata con glicerol y bilis de buey, una cepa del bacilo tuberculoso bovino era inocua para diversas especies animales (Franco-Paredes *et al.*, 2006). Esta variante atenuada recibió el nombre de «bacilo de Calmette-Guérin» (BCG) y se introdujo como una vacuna humana en 1921 (Young y Stewart, 2002); demostrando ser altamente eficaz en la protección contra la TB en los niños (Andersen y Doherty, 2005). Pronto se hizo popular en toda Europa, generalizándose su uso después de la II Guerra Mundial, al considerarse que era el único medio disponible para la prevención activa de una enfermedad que se había convertido en un importante problema de Salud Pública (Lienhardt *et al.*, 2012). A principios de la década de 1950, la vacunación con BCG se extendió masivamente en todo el mundo, después de que la OMS (Organización Mundial de la Salud) recomendara ampliar las campañas de vacunación a países en vías de desarrollo de África, Asia y América del Sur (Andersen y Doherty, 2005).

Durante casi toda la primera mitad del siglo XX se pudo comprobar que la TB era objeto de numerosos tratamientos sin que ninguno de ellos demostrara eficacia alguna. Pero el panorama cambió drásticamente cuando, en medio de la II Guerra Mundial, llegó el gran avance definitivo en el tratamiento de la TB: la introducción de la quimioterapia. A pesar de que el tratamiento farmacológico de infecciones no tuberculosas había comenzado unos años antes, con la introducción de la penicilina y las sulfonamidas, se comprobó que estos antibióticos no eran eficaces frente al bacilo descubierto por Koch (Herzog, 1998). Realmente, el primer agente bactericida y antibiótico efectivo para el tratamiento de la TB fue la estreptomina, aislada en 1943 por Albert Schatz (1920-2005) y Selman Waksman (1888-1973) a partir de *Streptomyces griseus* (Schatz y Waksman, 1944); aunque tuvo que pasar un año para que William H. Feldman (1892-1974) y H. Corwin Hinshaw (1902-2000) realizaran

pruebas en cobayas con TB y demostraran su eficacia (Feldman *et al.*, 1945). El 20 de noviembre de 1944, solo 15 meses después del descubrimiento de la estreptomina, Hinshaw y Feldman, en colaboración con Karl Pfuete, comenzaron el primer tratamiento en personas. Se trataba de una mujer joven que padecía una grave TB pulmonar, de la que no solo se recuperó, sino que incluso pudo incorporarse a una vida activa, casarse y tener hijos (Murray, 2004a).

El descubrimiento de la estreptomina supuso el comienzo de la edad de oro en el desarrollo de fármacos antituberculosos, al introducirse todos los antibióticos usados tradicionalmente para el tratamiento de esta enfermedad (Duncan, 2003), como son: ácido *p*-aminosalicílico (PAS, 1946), isoniacida (1952), cicloserina (1955), kanamicina (1957), rifampicina (1965), etionamida (1966), etambutol (1968) y pirazinamida (1970). Estos descubrimientos fueron muy importantes porque con la monoterapia de estreptomina no tardaron en aparecer mutantes resistentes que podían poner en peligro el éxito del tratamiento con antimicrobianos. No obstante, pronto se demostró que este problema se podía superar mediante el uso de combinaciones de dos o tres antibióticos (Herzog, 1998). En la década de 1970 se establecieron las bases modernas para el tratamiento de la TB. Fruto de un enorme esfuerzo por parte de las «Unidades de Tuberculosis» del *British Medical Research Council* y de todas las personas que aguantaron estoicas los diferentes regímenes terapéuticos (Cardona, 2006), surgió la terapia múltiple de «corta duración» que constituye la base del tratamiento recomendado por la OMS en la actualidad (Duncan, 2003): isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol (se puede sustituir por la estreptomina) diarios durante dos meses, y en los cuatro meses siguientes, solo isoniacida y rifampicina, también diarios.



Hermann Brehmer
1826–1889



Jean-Antoine Villemin
1827–1892



Albert Calmette
1863–1933



Robert Koch
1843–1910



Wilhelm Konrad von Röntgen
1845–1923



Selman Waksman
1888–1973

Figura 1: Pioneros en el estudio de la tuberculosis. Fuente: Herzog (1998).

El conocimiento del agente etiológico de la enfermedad, el desarrollo de la vacuna BCG, la disponibilidad de los primeros antibióticos efectivos y los avances en el diagnóstico, unidos a la mejora de las condiciones socioeconómicas e higiénicas, provocó el continuo descenso en las tasas de incidencia, prevalencia y mortalidad de la TB. Esto hizo que se perdiera el interés por esta enfermedad y cesaran los programas de control. Con todo, la inexorable expansión de la pandemia del sida en la década de 1980, junto con la aparición y generalización de cepas multirresistentes a los fármacos antituberculosos, cambió drásticamente la situación, resurgiendo, una vez más, el interés

por el bacilo tuberculoso. Al mismo tiempo, el escenario global de la TB ponía en evidencia la falta de eficacia de la vacuna BCG. Esta situación obligó a la OMS a declararla, en 1993, una emergencia de Salud Pública mundial (World Health Organization, 2013).

Estos factores, importantes en la reemergencia de la TB, hay que enmarcarlos en un contexto social en el que el incremento de la inmigración y de la pobreza en las grandes ciudades favoreció un aumento en la transmisión y el desarrollo de la enfermedad. Aun así, estos determinantes no habrían tenido un efecto tan importante de haber existido unos programas de control de la TB adecuados. Como consecuencia, muchos casos de TB no se diagnosticaban y, de los diagnosticados, muchos no recibían un tratamiento apropiado, produciéndose recidivas y la aparición de cepas resistentes y multirresistentes. El resultado final fue el incremento en la transmisión, y por lo tanto en la incidencia de la TB, así como en la mortalidad asociada a la enfermedad (Bloom y Murray, 1992).

Esta alarmante situación condujo a la revitalización de la lucha contra la TB en todo el mundo, después de décadas de abandono. Los primeros pasos se dieron a mediados de la década de 1990, con la implementación de la estrategia conocida como «DOTS» (*Directly Observed Therapy, Short-Course*). Un paquete de cinco medidas que constituye el marco de referencia para conseguir controlar de manera eficaz la TB (Lienhardt *et al.*, 2012). Un elemento clave de esta estrategia es la supervisión directa del tratamiento (Lienhardt *et al.*, 2012) y el apoyo al paciente para tomar los medicamentos de forma regular y a completar el tratamiento, logrando así la curación y evitando la aparición de resistencia a los fármacos. En el año 1999, se estableció la estrategia conocida como «DOTS-Plus» con el objetivo de estudiar la viabilidad de proyectos que permitiesen controlar la TB multirresistente (TB-MR) en países con

pocos recursos. Además, se impulsaron programas para coordinar el control de la TB con el del sida (Raviglione, 2003).

Un paso trascendental en la lucha contra la TB fue la creación, en el año 2000, de la «Alianza Alto a la Tuberculosis», como un movimiento mundial concebido para acelerar la adopción de medidas sociales y políticas encaminadas a detener la propagación de la TB en el mundo. En 2006 se puso en marcha el «Plan Mundial para Detener la Tuberculosis 2006-2015», en el que se describen las medidas y los fondos necesarios para acelerar los avances en el desarrollo de nuevos instrumentos contra la enfermedad y su aplicación en los países (Alianza Alto a la Tuberculosis y Organización Mundial de la Salud, 2006). El objetivo era conseguir, en consonancia con los «Objetivos del Desarrollo del Milenio», que la prevalencia y la mortalidad por TB se reduzcan a la mitad en el año 2015, en comparación con los niveles de 1990.

A pesar de todos estos esfuerzos, la ausencia de una prueba de diagnóstico barata y eficaz, la larga duración del tratamiento, la falta de una vacuna efectiva, la coinfección con el VIH, la aparición de TB-MR y la debilidad de los sistemas de salud en países en vías de desarrollo con escasos recursos económicos, son factores que siguen obstaculizando el progreso hacia la consecución del control de la TB en todo el mundo (Lawn y Zumla, 2011).

La TB es, en definitiva, una importante enfermedad reemergente cuya frecuencia de aparición ha sido constante en toda la historia de la humanidad (Zink *et al.*, 2007), y aunque es antigua, no es una enfermedad del pasado (Lienhardt *et al.*, 2012).

1.2. Situación actual de la tuberculosis

La TB continúa siendo una de las causas más importantes de enfermedad y muerte en muchos países y un importante problema de Salud Pública en todo el mundo. Según las estimaciones de la OMS, la carga mundial de TB sigue siendo enorme. Se calcula que en 2012 hubo 8.6 millones de nuevos casos de TB y que 1.3 millones de personas murieron por esta causa (320000 afectadas por el VIH). La mayoría de los casos y muertes por TB ocurren entre los hombres, pero la carga de la enfermedad entre las mujeres es también alta. En 2012, se estima que hubo 2.9 millones de nuevos casos y 410000 muertes por TB entre las mujeres. Asimismo, se calcula que 530000 niños (de 0 a 14 años) enfermaron de TB y 74000 niños seronegativos murieron por esta causa (World Health Organization, 2013).

Estos datos confirman la tendencia de los últimos informes, donde se ha podido observar que las tasas de incidencia han descendido desde 2002 y el número absoluto de casos de TB está disminuyendo desde 2006. De hecho, los nuevos casos de TB entre 2011 y 2012 han bajado en una proporción del 2 %. A su vez, la mortalidad de la TB ha disminuido en un 45 % desde 1990 (World Health Organization, 2013).

A pesar de los progresos logrados en las últimas décadas en la lucha contra esta enfermedad, la TB es un problema de salud que presenta todavía marcadas diferencias regionales y nacionales (fig. 2). Aunque las tasas de mortalidad e incidencia están disminuyendo en las seis regiones de la OMS, las regiones de África y Europa aún no están en camino de alcanzar la meta de la «Alianza Alto a la Tuberculosis». La mayor parte de los casos de 2012 se registraron en Asia (58 %) y África (27 %), con pequeñas proporciones de casos en las regiones del Mediterráneo Oriental (8 %), Europa (4 %) y América (3 %). Los cinco países con el número de casos más alto fueron: India (2.0-2.4 millones), China (0.9-1.1 millones), Sudáfrica (0.4-0.6 millones), Indonesia (0.4-0.5

millones) y Pakistán (0.3-0.5 millones). Solamente la India representa aproximadamente una cuarta parte (26 %) del total de casos de TB en todo el mundo, y China e India juntas representan el 38 % de los casos mundiales de TB (World Health Organization, 2013).

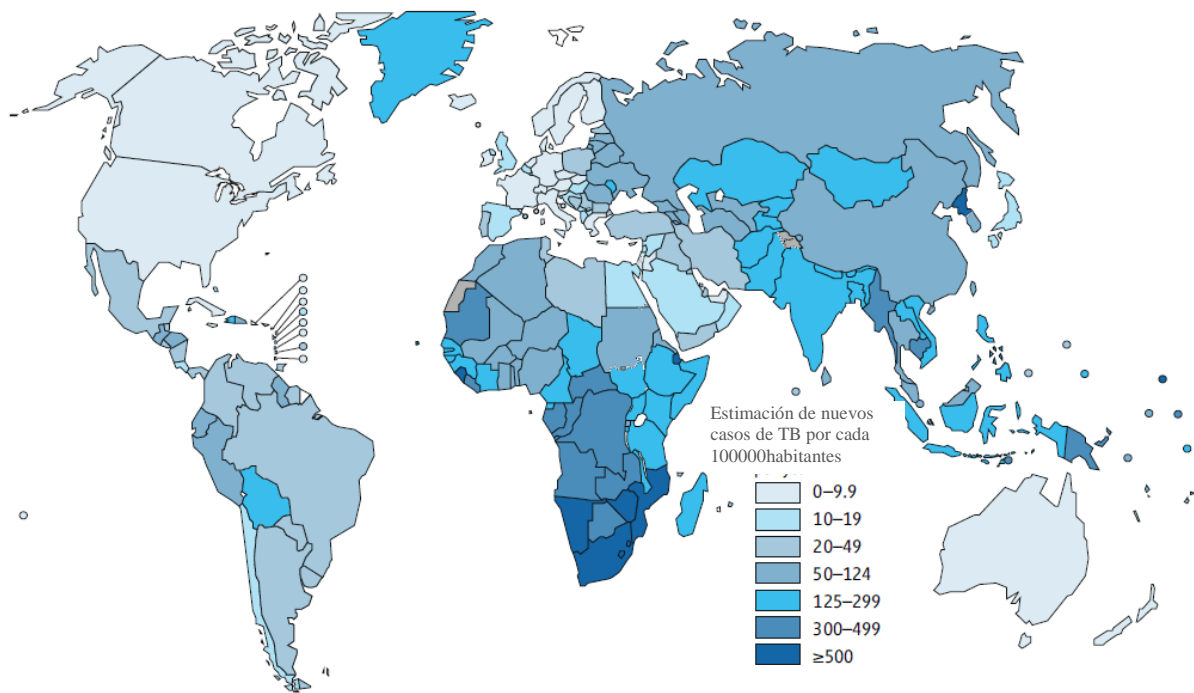


Figura 2: Estimación de las tasas de incidencia de la TB, 2012. (World Health Organization, 2013)

Por otro lado, de los 8.6 millones de nuevos casos en 2012, se estima que un 13 % son en pacientes infectados con el VIH. La proporción de casos de TB coinfectados por el VIH es mayor en los países de la región de África, que representa el 75 % de los casos de personas coinfectadas. Además, se estima que, en 2012, hubo 450000 casos de TB-MR. India, China, Rusia y Sudáfrica suman casi el 60 % de los casos mundiales de TB-MR. Las mayores proporciones de pacientes con TB-MR se encuentran en Europa Oriental y Asia Central. Por todo ello, es poco probable que se pueda cumplir en todo el mundo, especialmente en la región de África y del Mediterráneo Oriental, la meta de la «Alianza Alto a la Tuberculosis». No obstante, ya se alcanzó en la región de las

Américas y las estimaciones más optimistas sugieren que la región del Pacífico Occidental lo logró en 2012 (World Health Organization, 2013).

En el conjunto de los 53 países de la Región Europea de la OMS, la TB continúa siendo un problema importante de Salud Pública, con una amplia variabilidad entre países y un gradiente de incremento de la incidencia de Oeste a Este. La situación es particularmente preocupante en el Este de Europa y en algunos países de la antigua Unión Soviética; debido a altas tasas de TB-MR, el incremento en la incidencia de infección por el VIH, el deterioro socioeconómico y el deficiente desarrollo de los servicios de salud (World Health Organization, 2013).

En Europa, la vigilancia de la TB la realiza el Centro Europeo para la Prevención y Control de las Enfermedades (*European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC), en coordinación con la Oficina Regional de la OMS en la Región Europea. Los datos correspondientes al año 2011 recogidos en un informe emitido por el ECDC, muestran que prácticamente todos los países de la Unión Europea/Área Económica Europea (UE/AEE) tienen una tendencia descendente en las tasas de TB en los últimos cinco años. Si bien es cierto que la mayoría de países partían de valores bajos, por lo que los cambios no han sido tan notables en términos absolutos. Según este informe, Rumanía es el país con mayor tasa de notificación (89.7 casos por 100000 habitantes), seguido de: Lituania (58.7 casos por 100000 habitantes), Letonia (39.7 casos por 100000 habitantes), Bulgaria (32.1 casos por 100000 habitantes), Estonia (25.4 casos por 100000 habitantes), Portugal (23.9 casos por 100000 habitantes) y Polonia (22.2 casos por 100000 habitantes). No obstante, en cuanto a número de casos, y dentro de esta área, solo siete países declaran más de 3000 casos nuevos de TB: Rumanía (19212), Reino Unido (8963), Polonia (8478), España (6762), Francia (4942), Alemania (4316) e Italia (3521). Estos siete países concentran el 77.68 % de los casos en la UE/AEE en el

año 2011 (European Centre for Disease Prevention and Control y WHO Regional Office for Europe, 2013).

En lo que a España respecta, en el año 2012 se notificaron 6046 casos de TB, lo que corresponde a una tasa nacional de incidencia de 13.1 casos por 100000 habitantes. Esta tasa es un 11 % inferior a la del año 2011, en el que la tasa fue de 14.74 casos por 100000 habitantes (Centro Nacional de Epidemiología y Instituto de Salud Carlos III, 2013). Según datos de la OMS, la tasa de incidencia de TB en España durante el año 2011 fue de 16 (14-18) casos por 100000 habitantes (World Health Organization, 2013). Cifra similar a la notificada por la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica y a la suministrada por el ECDC, que en su informe anual incluye a España entre los países considerados de baja incidencia (menos de 20 casos por 100000 habitantes), con una tasa de notificación de 14.7 casos por 100000 habitantes (European Centre for Disease Prevention and Control y WHO Regional Office for Europe, 2013).

Sin embargo, no siempre se ha dado esta coincidencia en las cifras que describen el problema de la TB en nuestro país, resultando escasa la fiabilidad de estos datos hasta hace unos años. Entre las probables causas se puede citar que hasta 1995 solo era obligatoria la notificación numérica de casos de TB respiratoria, y hasta el año 2004 solo eran de declaración obligatoria en el ámbito estatal los casos de TB respiratoria y meningitis tuberculosa. A partir de ese año se añadieron las TB de otras localizaciones.

En este sentido, del total de casos en 2012, 4420 corresponden a TB respiratoria, 106 a meningitis tuberculosa y 1520 a TB de otras localizaciones (tasas de 9.57, 0.23 y 3.29 casos por 100000 habitantes, respectivamente). Esto supone para la TB respiratoria un descenso de un 12.45 % respecto al año 2011, en el que la tasa fue de 10.93 casos por 100000 habitantes. En la meningitis tuberculosa las tasas ascendieron ligeramente (de 0.22 a 0.23 casos por 100000 habitantes) y en la TB de otras localizaciones las tasas

descendieron un 7.59 % (de 3.56 a 3.29 casos por 100000 habitantes). En estas últimas, ha habido un incremento progresivo en las tasas de incidencia desde el año 2005 (2.03 casos por 100000 habitantes) al 2010 (3.78 casos por 100000 habitantes) debido fundamentalmente a una mejora de la notificación, iniciándose un descenso en 2011 (Centro Nacional de Epidemiología y Instituto de Salud Carlos III, 2013).

Por otro lado, ya con datos del año 2012, se puede destacar que la distribución de las tasas de incidencia por comunidades autónomas es desigual, lo que se debe a factores poblacionales, climatológicos y otros relacionados con los sistemas de vigilancia y control. En TB respiratoria, las mayores tasas se observaron en Ceuta (49.14 casos por 100000 habitantes), Melilla (17.99 casos por 100000 habitantes) y Galicia (15.51 casos por 100000 habitantes). Aunque las comunidades con mayor número de casos son Cataluña (835) y Andalucía (667). En meningitis tuberculosa las mayores tasas se declararon en Galicia (0.66 casos por 100000 habitantes) y Baleares (0.31 casos por 100000 habitantes); y por número de casos destacan Madrid y Cataluña (20). En la TB de otras localizaciones, Ceuta (14.23 casos por 100000 habitantes) y Galicia (8.38 casos por 100000 habitantes) presentan las mayores tasas; mientras que Cataluña (368) y Galicia (228) son las que tienen el mayor número de casos (Centro Nacional de Epidemiología y Instituto de Salud Carlos III, 2013).

Por su parte, Extremadura es una de las regiones con menor tasa de incidencia en el año 2012, con 9.7 casos por 100000 habitantes (106 casos de TB registrados). La tasa de incidencia media de la TB en Extremadura durante los últimos cinco años es de 10.17 casos por 100000 habitantes, más de un punto inferior a la media nacional. La Subdirección de Epidemiología del Servicio Extremeño de Salud ha realizado un estudio epidemiológico sobre la enfermedad en Extremadura entre 2004 y 2012, cuyas conclusiones señalan que en ese período se declararon 1119 casos; la mayor parte de

ellos (90 %) correspondientes a TB respiratorias. Esos datos reflejan una tendencia ligeramente descendente de la incidencia general de la enfermedad, pero también se observa un moderado incremento de las TB no respiratorias. Por áreas de salud, las tasas más altas se registran en las áreas de Plasencia (16.08 casos por 100000 habitantes) y Don Benito-Villanueva de La Serena (12.4 casos por 100000 habitantes), mientras que las más bajas se producen en las áreas de Llerena-Zafra (6.1 casos por 100000 habitantes) y Cáceres (8.79 casos por 100000 habitantes). El mayor número de casos se da en el grupo de edad de 15 a 44 años, aunque desde el año 2010 la incidencia está descendiendo en ese grupo, al tiempo que aumenta en los menores de 14 años. Por sexos, afecta en mayor medida a los hombres, de manera que por cada mujer que enferma por TB respiratoria lo hacen dos hombres (Subdirección de Epidemiología del Servicio Extremeño de Salud, 2013).

La TB es, por consiguiente, una enfermedad infecciosa con características de pandemia mundial que en nuestro país, aunque a menor escala, constituye también un importante problema de Salud Pública. De los datos disponibles se deduce que España tiene una endemia tuberculosa superior a la de los países de su entorno socioeconómico, con excepción de Portugal. De hecho, un estudio reciente realizado a partir de los datos publicados por la OMS (*Global Health Atlas Database*), en el que se muestra la evolución de la tasa de notificación en más de 50 países europeos desde 1980 hasta 2006, concluye que España ha empeorado su situación en el período 1992-2006. Los autores atribuyen esta situación a la elevada prevalencia de personas con infección por el VIH y la influencia de los movimientos migratorios (Ríos y Monleón-Getino, 2009).

Los movimientos migratorios masivos desde países con alta prevalencia de TB y las condiciones de vida a la que se ven sometidos estos inmigrantes han provocado un aumento de las tasas de enfermedad en muchos países de la UE. Este incremento se ha

producido a expensas de este grupo poblacional, sin que haya evidencia de que pueda estar afectando a la epidemiología de la enfermedad en la población autóctona. Esta nueva circunstancia requiere intensificar los esfuerzos con programas de control y actividades que aseguren un diagnóstico temprano, la disponibilidad de una terapia adecuada, el seguimiento y finalización del tratamiento hasta asegurar la curación, así como acciones dirigidas a poblaciones vulnerables con un alto riesgo de infección o que viven en situaciones desfavorables (Grupo de Trabajo de Tuberculosis de las Sociedades Científicas *et al.*, 2008).

1.3. Futuro: esperanzador, pero lleno de retos e incertidumbres

Los resultados obtenidos con la aplicación de las estrategias «DOTS», «Alto a la Tuberculosis» y el «Plan Mundial para Detener la Tuberculosis 2006-2015» son evidentes. La epidemia está en un constante, aunque moderado y lento, declive. A pesar de ello, más de 9 millones de personas aún desarrollan TB activa cada año y cerca de 2 millones mueren. Estas cifras no deben desanimar a nadie, sino más bien, servirnos para reconocer que la TB es una pandemia única, y el camino hacia su eliminación será largo y difícil (Raviglione *et al.*, 2012). Por ello, con el «Plan Mundial para Detener la Tuberculosis 2011-2015: orientemos la lucha hacia la eliminación de la tuberculosis», se ha pretendido renovar la intensidad de los esfuerzos con el propósito de alcanzar metas nuevas y más ambiciosas; encaminadas a conseguir la eliminación de la TB como problema de Salud Pública en el año 2050⁸. Pero esto solo será posible si se logra mejorar la forma en la que se diagnostica, se trata y se previene esta enfermedad. En atención a lo cual, en este nuevo plan, se señalan por primera vez todas las lagunas en investigación que deberán cubrirse para sacar al mercado pruebas de diagnóstico rápido

⁸ Para el año 2050 se ha fijado la meta de conseguir la eliminación de esta enfermedad alcanzando menos de un caso de TB por 1000000 habitantes.

de la enfermedad, regímenes terapéuticos más cortos y una vacuna plenamente eficaz. Además, se indica cómo se debe orientar el acceso universal hacia la atención antituberculosa en los programas de Salud Pública, incluida la manera de modernizar los laboratorios de diagnóstico y adoptar algunas pruebas innovadoras de diagnóstico de la TB disponibles desde hace poco (World Health Organization, 2010). Como la prueba molecular rápida «Xpert MTB/RIF», que permite diagnosticar la TB y la resistencia a la rifampicina en 100 minutos. Se espera que el uso de esta prueba rápida se incremente todavía más tras la reducción de su precio en un 41 % (de 16.86 a 9.98 dólares estadounidenses) en agosto de 2012. En los últimos años, también se están haciendo progresos en el desarrollo de nuevos fármacos y vacunas. Hay nuevos antituberculosos y regímenes terapéuticos para la TB farmacosenible y farmacorresistente que están siendo investigados en ensayos clínicos o examinados por los organismos de reglamentación farmacéutica. Asimismo, según la OMS, hay 11 vacunas para prevenir la TB que se encuentran en distintas fases de desarrollo y cabe la posibilidad de que en 2020 se haya autorizado por lo menos una vacuna nueva (World Health Organization, 2013).

No obstante, el futuro control de la TB no solo va a estar supeditado a los avances que se produzcan en el campo de la medicina y al fortalecimiento de los sistemas sanitarios, sino que también dependerá de los esfuerzos que se lleven a cabo para abordar los determinantes sociales de la TB, así como los factores de riesgo que predisponen a padecer esta enfermedad (Raviglione y Krech, 2011). Estos incluyen la desnutrición, el hacinamiento, la infección por el VIH, el tabaquismo, el abuso de alcohol y otras drogas, la diabetes, las enfermedades mentales (Raviglione y Krech, 2011); y sobre todo, las situaciones sociales y económicas que favorecen la exposición a estos factores de riesgo (Rasanathan *et al.*, 2011). Actuar sobre los determinantes

sociales es primordial para el cumplimiento de las metas marcadas en el último «Plan Mundial para Detener la Tuberculosis 2011-2015: orientemos la lucha hacia la eliminación de la tuberculosis»; entre ellas, recordemos, conseguir su eliminación en el año 2050. Para ello, es preciso continuar con los importantes progresos que se han alcanzado en la atención clínica de la enfermedad, pero será necesario ampliar el ámbito de aplicación de las medidas de control más allá de lo que se ha venido haciendo hasta el momento (Rasanathan *et al.*, 2011).

Para lograr el máximo control de la TB, los países deben avanzar rápidamente hacia el acceso universal a servicios de prevención, diagnóstico y tratamiento de todas las formas de TB. La sociedad civil, las empresas y todos los agentes implicados en la provisión de asistencia sanitaria, sean públicos o privados, deben trabajar unidos para lograr el acceso universal a la atención antituberculosa en todos los rincones del planeta, un objetivo que requiere la modernización de los laboratorios, el acceso a medicamentos de calidad y medidas para movilizar los recursos necesarios. En el contexto de la salud y el desarrollo humano, la investigación para progresar en el control de la TB está íntimamente asociada a los esfuerzos para aliviar la pobreza y promover el desarrollo social y económico (Lienhardt *et al.*, 2012).

Por otra parte, la financiación del tratamiento y control de la TB presenta un déficit crítico. Entre 2013 y 2015, en los países de ingresos bajos y medios se necesitarán hasta 8000 millones de dólares anuales; pero el déficit de financiación alcanza los 3000 millones de dólares anuales. La financiación por donantes internacionales privados es especialmente necesaria para mantener los avances recientes y garantizar su continuidad en 35 países con ingresos bajos (25 de ellos africanos) en los que estos donantes aportan más del 60 % de la financiación. También hay un déficit de financiación crítico para la investigación y el desarrollo, que requiere 2000 millones de

dólares anuales (World Health Organization, 2013). Solucionar este déficit de financiación sigue siendo un problema acuciante, a pesar de haberse probado la efectividad de las intervenciones para luchar contra la TB y los millones de vidas salvadas, en comparación con el coste que esto supone. Sin duda alguna, se necesita un compromiso todavía mayor por parte de los gobiernos, organizaciones no gubernamentales y otras organizaciones sociales, así como de los donantes privados, si realmente se pretende conseguir el control mundial de la TB y, en última instancia, su eliminación (Raviglione *et al.*, 2012).

2. Género *Mycobacterium*

El término *Mycobacterium* (*M.*) fue acuñado por Lehmann y Neumann para referirse a un grupo de bacterias, algunas con la capacidad para formar películas parecidas a las de los hongos al crecer en medio líquido (Lehmann y Neumann, 1896), que presentaban características similares. Por tanto, el bacilo tuberculoso y el bacilo de la lepra, originalmente llamados *Bacterium tuberculosis* (Zopf, 1883) y *Bacillus leprae* (Hansen, 1880) respectivamente, no se consideraron micobacterias hasta que en 1896 Lehmann y Neumann propusieron que se incluyeran dentro del género *Mycobacterium*; ya que ambas especies tenían la capacidad de resistir la decoloración con alcohol clorhídrico. De esta forma, los convirtieron en los primeros miembros de este nuevo taxón, renombrándolos como: *M. tuberculosis* y *M. leprae* (Shinnick y Good, 1994).

Los miembros de este género se caracterizan por ser bacilos rectos o ligeramente curvados, aerobios, inmóviles y no formadores de esporas (Barksdale y Kim, 1977). Además de estas características compartidas por todas las micobacterias, los requisitos mínimos necesarios para incluir una especie dentro del género *Mycobacterium* son: la ácido-alcohol resistencia; la presencia en su pared celular de ácidos micólicos de 60 a 90 átomos de carbono, que se degradan por pirólisis en ésteres de ácidos grasos de 22 a 26 átomos de carbono; y un contenido de guanina y citosina (G+C) en su ADN que puede variar entre el 61 y 71 % (Levy-Frebault y Portaels, 1992), excepto en *M. leprae*, que tiene un 58 % (Rastogi *et al.*, 2001).

El alto contenido de lípidos de la pared celular de las micobacterias es uno de los rasgos fundamentales que sentaron las bases de la identificación de este género, dotándolas entre otras propiedades de sus particulares características tintoriales. En ese aspecto, el género *Mycobacterium* está incluido dentro de las bacterias grampositivas, aunque la gran cantidad de lípidos de elevado peso molecular que presenta su pared

celular hace que sean difíciles de teñir por la tinción de Gram. A su vez, cuando se tiñen con colorantes básicos como la fucsina resisten la decoloración con mezcla de etanol al 95 % y de ácido clorhídrico al 3 %, denominándose por este motivo ácido-alcohol resistente. En esta propiedad de las micobacterias se basa la técnica de la tinción de Ziehl-Neelsen, que ha servido para denominar y agrupar al género como entidad independiente del resto de bacterias.

2.1. Taxonomía de las micobacterias

La segunda edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* encuadra al género *Mycobacterium* en el *phylum Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, subclase *Actinobacteridae*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacterineae*, familia *Mycobacteriaceae* (Bergey, 2005). En la actualidad, según la lista elaborada por J. P. Euzéby (Euzéby, 2014), hay descritas más de 160 especies dentro del género *Mycobacterium*.

La clasificación de estas especies no se basa solo en las homologías genéticas, como ocurre en la mayoría de las bacterias, sino que también tiene en cuenta características patogénicas, clínicas y epidemiológicas. Así, en las últimas décadas se han propuesto numerosas clasificaciones de este género, atendiendo, primero, a sus características fenotípicas, a su patogenicidad y, desde finales del siglo pasado, a los genotipos.

Una de las clasificaciones más aceptadas es aquella que divide a las micobacterias en dos grandes grupos: micobacterias difícilmente cultivables o no cultivables (*M. lepraemurium* y *M. leprae*) y micobacterias cultivables. A su vez, estas últimas se dividen en función de la velocidad de crecimiento en: micobacterias de crecimiento rápido, si forman colonias visibles en medios de cultivo sólidos en menos

de siete días, como *M. smegmatis*; y micobacterias de crecimiento lento, si requieren más de siete días para producir colonias visibles en medio sólido, como *M. tuberculosis* y *M. bovis* (Shinnick y Good, 1994).

El grupo de micobacterias de crecimiento lento incluye las bacterias de mayor importancia tanto en Sanidad Animal como en Salud Pública. En este grupo se encuadra el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC) que comprende todas las especies bacterianas causantes de la TB en seres humanos y otros mamíferos; y el complejo *Mycobacterium avium* (*Mycobacterium avium* complex, MAC) que también tiene importancia en Sanidad Animal y, recientemente, está adquiriendo una creciente repercusión en el ámbito de la Salud Pública.

El MAC pertenece al grupo de las micobacterias atípicas, que integra a todas las especies del género *Mycobacterium* capaces de producir enfermedades en el ser humano y los animales, excepto las que forman el MTBC y *M. leprae*. Aunque el término «atípicas» ha sido muy criticado y se han propuesto diversas alternativas, como micobacterias no tuberculosas (NTM, *nontuberculous mycobacteria*), micobacterias ambientales, micobacterias anónimas o micobacterias distintas del bacilo tuberculoso (MOTT, *mycobacteria other than tubercle bacilli*), el hecho cierto es que sigue siendo ampliamente utilizado en la literatura médica y en la práctica clínica (Fonseca-Capdevila, 2011).

Durante muchos años se ha venido utilizando la clasificación propuesta por Runyon que divide a las micobacterias atípicas en cuatro grupos (Runyon, 1959), basándose en características fenotípicas como la velocidad de crecimiento y la capacidad de producir pigmento con o sin exposición a la luz. En los grupos I, II y III solo se incluyen micobacterias de crecimiento lento, mientras que en el grupo IV se engloba a las de crecimiento rápido. El grupo I de Runyon comprende especies

fotocromógenas, que solo producen pigmentos cuando las colonias son expuestas a la luz, como *M. kansasii* o *M. marinum*. El grupo II está formado por especies escotocromógenas, en las que la producción de pigmento amarillo-naranja es independiente de las condiciones lumínicas durante la incubación, como *M. gordonae* o *M. scrofulaceum*. El grupo III contiene especies no cromógenas como *M. intracellulare*, *M. avium* o *M. xenopi*. Finalmente, el grupo IV de Runyon incluye especies de crecimiento rápido como *M. fortuitum* o *M. chelonae* (Rastogi *et al.*, 2001).

Los avances en las técnicas de diagnóstico e identificación de nuevas especies hacen que la clasificación de Runyon no tenga, en la actualidad, validez taxonómica. Aunque sí conserva una utilidad clínica, puesto que las bacterias de crecimiento rápido afectan sobre todo a la piel, las articulaciones y los huesos, y son más susceptibles al tratamiento farmacológico; mientras que las de crecimiento lento producen fundamentalmente infecciones ganglionares y respiratorias, y tienen peor respuesta a los fármacos (Tortoli, 2009).

De acuerdo con la importancia clínica, las micobacterias se pueden clasificar en agentes patógenos obligados o estrictos, agentes patógenos oportunistas o potenciales y agentes patógenos poco comunes o saprofitos (Hartmans *et al.*, 2007). Los microorganismos patógenos obligados son aquellos que no se multiplican de forma natural fuera de un organismo vivo e incluyen micobacterias que afectan a los seres humanos como *M. leprae* y *M. tuberculosis*; y micobacterias propias de animales como *M. bovis*. Entre los agentes patógenos oportunistas destacan las micobacterias de crecimiento lento *M. avium*, *M. kansasii*, *M. marinum* y *M. scrofulaceum*; y las micobacterias de crecimiento rápido *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. abscessus*. Este grupo incluye bacterias aisladas en diferentes biotopos naturales pero que pueden causar infecciones, especialmente en personas inmunodeprimidas, así como en heridas

traumáticas o quirúrgicas. Por su parte, las micobacterias saprofitas se han aislado en una gran variedad de ambientes e incluyen unas pocas micobacterias de crecimiento lento como *M. gordonae* o *M. terrae*, y la mayoría de micobacterias de crecimiento rápido como *M. smegmatis*. Algunas de las micobacterias saprofitas se han aislado como contaminantes en procesos patológicos en contadas ocasiones (Rastogi *et al.*, 2001).

La clasificación de las distintas especies de micobacterias se ha realizado tradicionalmente en función de la velocidad y temperatura óptima de crecimiento, la pigmentación y morfología de las colonias, los requerimientos del cultivo y la capacidad de crecer en presencia de inhibidores como el *p*-nitrobenzoato o la hidroxilamina. Asimismo se han empleado características bioquímicas como, por ejemplo, la presencia o ausencia de ureasa, arilsulfatasa o catalasa, y propiedades específicas de esas enzimas, como la termorresistencia de la catalasa (Rastogi *et al.*, 2001). Así pues, el número de pruebas para clasificar a las micobacterias ha ido en aumento a medida que se han ido describiendo nuevas especies. Para facilitar el análisis de toda esta información se adoptó, a finales de la década de 1960, la taxonomía numérica. En este sistema, a cada propiedad o característica se le asigna un valor determinado, y la agrupación de las distintas especies se realiza de acuerdo con el número de similitudes compartidas (Wayne, 1981).

Posteriormente, los avances en el terreno de la biología molecular y de la genética bacteriana han permitido realizar la clasificación taxonómica de las micobacterias basándose en los polimorfismos presentes en las secuencias de diferentes genes que se emplean como diana. Entre estos, podemos destacar al gen que codifica la subunidad 16S del ARN ribosómico (ARNr 16S), que se caracteriza por presentar en su secuencia regiones altamente conservadas junto con otras muy variables (Böddinghaus

et al., 1990). Otro aspecto destacable del gen del ARNr 16S es la presencia de una sola copia del mismo en casi todas las micobacterias de crecimiento lento, excepto *M. terrae* (Ninet *et al.*, 1996) y *M. celatum* (Reischl *et al.*, 1998); mientras que las de crecimiento rápido, exceptuando a *M. chelonae* y *M. abscessus*, presentan dos copias (Tortoli *et al.*, 2004).

El análisis de la secuencia del gen que codifica para el ARNr 16S ha sido la herramienta más utilizada para los estudios taxonómicos y filogenéticos del género *Mycobacterium* (Stahl y Urbance, 1990; Tortoli, 2003; Tortoli, 2006). La secuenciación de este gen ha permitido establecer una relación filogenética más comprensible, que coincide de un modo general con los estudios de taxonomía numérica. De esta forma, se ha dividido a las micobacterias en dos categorías que se corresponden con los dos grupos principales de la clasificación basada en la velocidad de crecimiento. Además, con estos estudios se ha demostrado que las micobacterias de crecimiento lento evolucionaron a partir de las de crecimiento rápido (Rogall *et al.*, 1990; Hartmans *et al.*, 2007).

Existen otras regiones genómicas que también se han utilizado como dianas para la identificación del género *Mycobacterium*, entre las que destacan: el gen *hsp65*, el gen superóxido dismutasa, la región comprendida entre los genes que codifican el ARNr 16S y 23S (Tortoli, 2003); así como los genes *recA* y *rpoB* (Adékambi y Drancourt, 2004). Recientemente se ha propuesto un nuevo marcador taxonómico para clasificar a las micobacterias: el gen que codifica para la enzima DprE1 (Incandela *et al.*, 2013); una proteína esencial que interviene en el metabolismo de la pared celular.

2.2. Envoltura celular

Las micobacterias presentan una envoltura celular característica que se puede dividir en tres componentes estructurales: membrana plasmática, pared celular y cápsula (Daffé y Draper, 1998). Esta división, conceptualmente simplificada, es más compleja en la práctica. En muchos casos es difícil diferenciar experimentalmente la localización exacta de algunos lípidos, especialmente entre la pared y la cápsula, que incluso se han aislado en más de un compartimiento (Ortalo-Magné *et al.*, 1996). Además, se debe tener en cuenta que en las micobacterias en crecimiento, la envoltura celular es una estructura dinámica en continua reorganización (Daffé y Draper, 1998).

La pared celular que rodea la membrana plasmática está constituida fundamentalmente por peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos unidos de forma covalente. Estos componentes constituyen el denominado «complejo ácidos micólicos-arabinogalactano-peptidoglicano» que se extiende desde la membrana plasmática hacia el exterior formando capas (Hett y Rubin, 2008). Este complejo es insoluble y representa la estructura esencial de la envoltura celular micobacteriana (Brennan, 2003). Muchos de los fármacos utilizados para combatir las micobacterias tienen como diana a este complejo (Hett y Rubin, 2008). A su vez, la pared celular también está formada por otros componentes no unidos covalentemente, principalmente lípidos y glicolípidos que comprenden una extraordinaria variedad de estructuras, algunas comunes en todas las micobacterias y otras presentes solo en algunas especies (Brennan y Nikaido, 1995).

La parte más externa de la envoltura celular de las micobacterias, denominada cápsula, está constituida por una mezcla de polisacáridos y proteínas, más una cantidad relativamente pequeña de lípidos (Ortalo-Magné *et al.*, 1995; Lemassu *et al.*, 1996; Daffé y Etienne, 1999). Sin embargo, sus componentes no están unidos covalentemente

a la pared celular y por ello no se puede considerar a esta estructura como una cápsula en el sentido más estricto del término (Roberts, 1996), aunque funcionalmente sí se comporte como tal (Daffé y Etienne, 1999). Los componentes principales de la cápsula son las proteínas y los polisacáridos neutros: glucano, arabinomanano y manano (Ortalo-Magné *et al.*, 1995). También es posible encontrar polisacáridos ligados a lípidos como el lipoarabinomanano o el lipomanano (Hett y Rubin, 2008). Los pocos lípidos presentes en la cápsula estarían localizados más internamente y, a la vez, se corresponden con los lípidos libres más externos de la pared celular. Todos estos componentes constituyen la parte soluble de la envoltura celular y representan un elemento esencial en la señalización de las micobacterias (Brennan, 2003) durante el proceso de interacción con el sistema inmunitario del hospedador (Hett y Rubin, 2008).

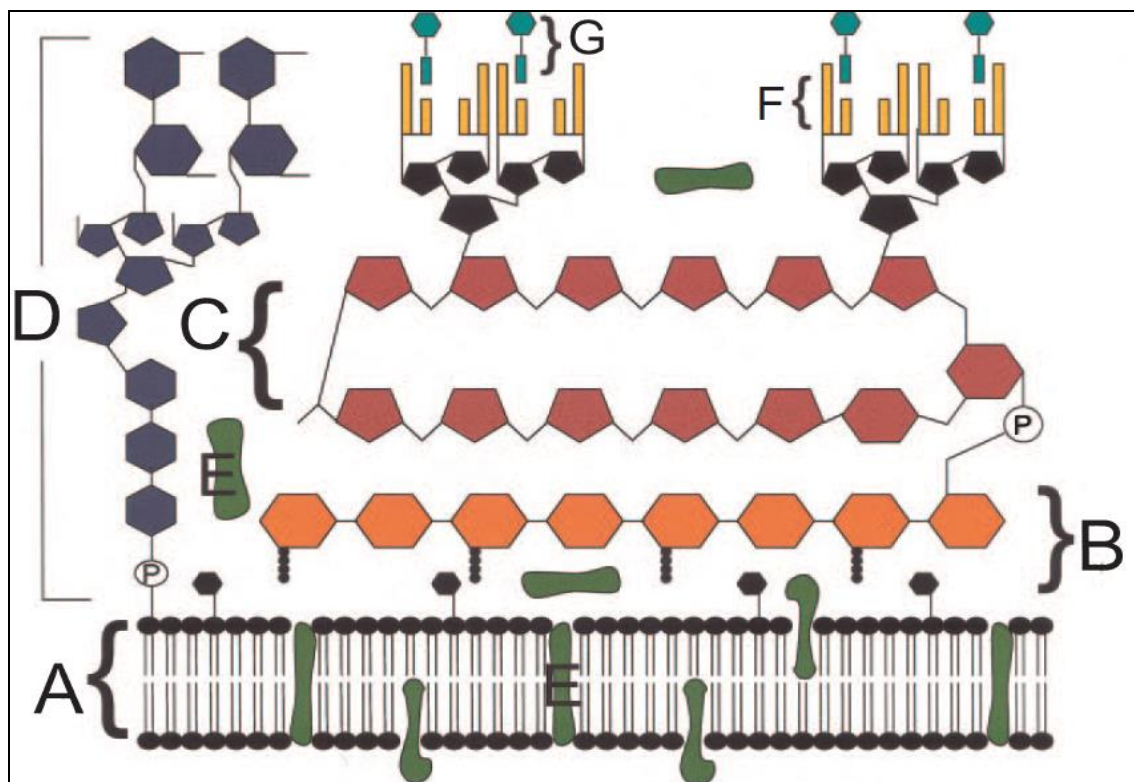


Figura 3: Representación esquemática de la envoltura celular de *M. tuberculosis*. Los componentes incluyen la membrana citoplasmática (A), peptidoglicanos (B), arabinogalactano (C), lipoarabinomanano (D), proteínas de pared asociadas a la membrana citoplasmática (E), ácidos micólicos (F) y moléculas de glicolípidos de la superficie asociadas a los ácidos micólicos (G) (Karakousis *et al.*, 2004).

La inusual composición y estructura de la envoltura celular es responsable de muchas de las características del género *Mycobacterium* como la ácido-alcohol resistencia, el crecimiento en forma de cordones de algunas especies, la morfología colonial y la extraordinaria resistencia de las micobacterias a agentes físicos y químicos (Barry III, 2001). De hecho, la ineficacia frente a las micobacterias de la mayoría de los antimicrobianos de uso común se debe en gran parte a la elevada impermeabilidad de esta envoltura (Brennan, 2003). Por ello, resulta fundamental la identificación de dianas sensibles donde poder dirigir la acción de nuevos medicamentos, como la enzima DprE1, que participa en la biosíntesis de un componente esencial de la pared celular micobacteriana (Riccardi *et al.*, 2013).

De la misma forma, el alto contenido en lípidos de la pared celular de las micobacterias y la longitud de la cadena de los ácidos micólicos les confiere una gran resistencia ambiental, pudiendo sobrevivir durante largos períodos de tiempo en el medio ambiente en condiciones de baja humedad. Sin embargo, las micobacterias son sensibles al efecto de la luz solar, las radiaciones ultravioletas y la pasteurización.

3. Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

El apelativo «complejo *Mycobacterium tuberculosis*» (MTBC), aunque no está formalmente aceptado como una categoría taxonómica, se aplica actualmente para identificar a un grupo de bacterias que están estrechamente emparentadas con *M. tuberculosis* (García-Betancur *et al.*, 2012), el principal agente etiológico de la TB humana. Los miembros del MTBC se caracterizan por presentar una similitud en el 99.9 % de sus nucleótidos y por tener secuencias prácticamente idénticas de la subunidad 16S del ARNr (Böddinghaus *et al.*, 1990; Sreevatsan *et al.*, 1997; Huard *et al.*, 2006), aunque difieren ampliamente en su adaptación a determinados hospedadores, fenotipos y poder patógeno (Brosch *et al.*, 2002).

Los miembros clásicos del MTBC son: *M. tuberculosis* (Koch, 1882; Lehmann y Neumann, 1896), *M. bovis* (Karlson y Lessel, 1970), *M. bovis* BCG (Grange *et al.*, 1983), *M. africanum* (Castets *et al.*, 1968; Castets *et al.*, 1969) y *M. microti* (Wells y Oxon, 1937; Reed, 1957). Más recientemente se han incorporado: *M. canettii* (van Soolingen *et al.*, 1997; Pfyffer *et al.*, 1998), *M. caprae* (Aranaz *et al.*, 1999; Aranaz *et al.*, 2003), *M. pinnipedii* (Cousins *et al.*, 1993; Cousins *et al.*, 2003), *M. mungi* (Alexander *et al.*, 2010), *M. orygis* (Lomme *et al.*, 1976; van Ingen *et al.*, 2012) y *M. suricattae* (Parsons *et al.*, 2013). Existen otras dos variantes genéticas en el MTBC denominadas «Dassie bacillus» (Wagner *et al.*, 1958) y «Chimpanzee bacillus» (Coscolla *et al.*, 2013), que han sido aisladas en mamíferos salvajes en África.

Estas micobacterias se han mantenido como especies diferentes por cuestiones prácticas y ciertas diferencias fenotípicas y epidemiológicas. No obstante, la estrecha relación genética que existe entre ellas y la similitud de los procesos patológicos que causan, hacen que todas ellas puedan ser consideradas como una única especie bacteriana (Imaeda, 1985); compuesta, a su vez, por varios «ecotipos» (Cohan, 2002) de

M. tuberculosis, cada uno de los cuales está preferentemente adaptado a determinadas especies de mamíferos (Smith *et al.*, 2006b). Así, en términos generales, mientras que *M. tuberculosis* y *M. africanum* son casi exclusivamente agentes patógenos de los seres humanos, *M. microti* causa enfermedad en roedores y *M. pinnipedii* afecta principalmente a mamíferos marinos. El miembro que cuenta con mayor número de hospedadores es *M. bovis*, el agente etiológico de la TB bovina; se aísla principalmente en ganado vacuno, pero también causa TB en otros animales, tanto domésticos como salvajes (Gordon *et al.*, 2009). *M. bovis* puede infectar también a los seres humanos, aunque no se transmite fácilmente entre personas⁹ (O'Reilly y Daborn, 1995).

Igualmente se ha observado que existen diferencias genotípicas y marcadores genéticos claramente reconocibles entre los distintos miembros del MTBC (Mostowy *et al.*, 2002; Parsons *et al.*, 2002). Esto ha sido posible gracias al desarrollo de la biología molecular y el conocimiento del genoma de algunos integrantes de este complejo (Cole *et al.*, 1998; Garnier *et al.*, 2003; Mostowy y Behr, 2005; Behr y Mostowy, 2007). La secuenciación completa del genoma de la cepa de referencia H37Rv de *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998), reveló una cantidad considerable de elementos genéticos repetitivos, que varían en tamaño, estructura y localización. En el MTBC se pueden distinguir dos grupos principales de secuencias repetitivas: las repeticiones en tándem¹⁰ (*tandem repeats*, TR) y las repeticiones intercaladas (*interspersed repeats*, IR). Un tipo de secuencias IR muy destacado está compuesto por unos elementos genéticos móviles comúnmente conocidos como: secuencias de inserción (*insertion sequence*, IS). Además de estos elementos repetitivos, también se han detectado mutaciones puntuales en varios genes o regiones específicas del genoma que están presentes en algunos miembros del

⁹ Recientemente se ha descubierto que este fenómeno puede deberse a mutaciones que están presentes en *M. bovis* y que afectan a un sistema de regulación de la virulencia llamado «PhoPR» (Gonzalo-Asensio *et al.*, 2014).

¹⁰ Encontrar acomodo en nuestro idioma a un concepto proveniente de otro, utilizando palabras semejantes, no suele ser fácil. Como ocurre en tantas otras ocasiones, la traducción del término inglés *tandem* por la locución adverbial en castellano «en tándem», no es del todo correcta. Por ello, cuando hablemos de «repeticiones (o secuencias repetidas) en tándem», nos estaremos refiriendo a secuencias que se repiten de forma consecutiva en un *locus* específico.

MTBC y ausentes en otros. Esta información se ha utilizado para desarrollar técnicas que permiten la discriminación entre las diferentes especies que integran el MTBC, así como entre las distintas cepas de una misma especie. El desarrollo de esos métodos de caracterización molecular y el empleo, en alguno de ellos, de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, en particular, la «Reacción en cadena de la polimerasa» (*polimerase chain reaction*, PCR), han supuesto un gran avance en la mejora del conocimiento de este grupo de bacterias.

Los métodos más usados para la caracterización genotípica de los miembros del MTBC incluyen marcadores moleculares como: la IS6110, secuencias repetitivas polimórficas ricas en G+C (*polymorphic GC-rich repetitive sequences*, PGRS), secuencias de repetición directa (*direct repeat*, DR) o secuencias que se repiten en tándem y cuyo número, en el mismo *locus*, varía entre las cepas (*variable-number tandem repeats*, VNTR). También son útiles, especialmente en estudios filogenéticos, los métodos basados en secuencias no repetitivas, como el «Análisis de polimorfismos de un solo nucleótido» (*single-nucleotide polymorphisms*, SNP) o la detección de deleciones, que en general son conocidas como «Regiones de diferencia» (*region of difference*, RD) o «Polimorfismos de gran secuencia» (*large-sequence polymorphisms*, LSP).

El hecho de que el MTBC sea esencialmente clónico y existan pocas evidencias de intercambio horizontal de genes entre los diferentes linajes (Supply *et al.*, 2003; Hirsh *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2006a), ha permitido utilizar los polimorfismos presentes en el genoma de estas bacterias para establecer la filogenia del complejo (Brosch *et al.*, 2002; Mostowy *et al.*, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2005; Huard *et al.*, 2006; Hershberg *et al.*, 2008; Wirth *et al.*, 2008). De esta forma, se ha podido observar que los miembros del MTBC han sufrido una evolución reductiva por la

pérdida unidireccional de secuencias cromosómicas (Donoghue, 2011). En ausencia de recombinación, una vez que una región no repetitiva del genoma ha sido eliminada, no puede ser reemplazada, y esa delección actúa, por lo tanto, como un marcador genético de un clon y todos sus descendientes (Smith *et al.*, 2006a). Basándose en estas observaciones, Brosch *et al.* (2002) propusieron un nuevo escenario evolutivo para este grupo de bacterias. Este escenario considera que es probable que los miembros del MTBC desciendan de un progenitor común, denominado «*M. prototuberculosis*» (Gutiérrez *et al.*, 2005); que habría surgido tras un «cuello de botella» evolutivo hace unos 15000-35000 años (Sreevatsan *et al.*, 1997; Brosch *et al.*, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2005; Djelouadji *et al.*, 2011).

A partir de ese ancestro común se derivaron, inicialmente, *M. canettii* y, posteriormente, dos linajes principales; uno de los cuales parece que se extendió exclusivamente entre los seres humanos (Wirth *et al.*, 2008). De este linaje «humano» se derivaron ulteriormente las cepas «modernas» de *M. tuberculosis*. Estas cepas «modernas», responsables de importantes epidemias, presentan una delección (en la región 1) específica de *M. tuberculosis* (TbD1), que no aparece en las cepas «ancestrales» (Brosch *et al.*, 2002). Estudios filogenéticos posteriores han demostrado que esta alteración en el genoma de *M. tuberculosis* resulta esencial para poder dividir las cepas de esta especie en «ancestrales» y «modernas»¹¹ (Hershberg *et al.*, 2008; Wirth *et al.*, 2008).

El otro linaje, que se separó del progenitor común antes incluso de que ocurriese la delección TbD1 (Brosch *et al.*, 2002), se caracteriza por la ausencia de una región cromosómica específica, la región de diferencia 9 (RD9), que está intacta en todas las cepas de *M. tuberculosis* (Brosch *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2006a; Smith *et al.*, 2009).

¹¹ El concepto de «ancestral» se ha utilizado de manera confusa (Arnold *et al.*, 2006; Gagneux *et al.*, 2006; Mathema *et al.*, 2006; Flores *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2008). Para evitar equivocaciones, Smith *et al.* (2009) recomiendan referirse a las cepas «ancestrales» como «TbD1-intacta» y a las «modernas» como «TbD1-perdida».

Este linaje sin la RD9, engloba a todos los «ecotipos» adaptados a los animales (Smith *et al.*, 2006b): *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. bovis*, *M. mungi*, *M. orygis*, *M. suricattae*, «Dassie bacillus» y «Chimpanzee bacillus». Además, incluye también a *M. africanum*, una especie aparentemente adaptada a los hombres pero que podría haberse originado a partir de un reservorio animal desconocido (Wirth *et al.*, 2008). Recientemente, se ha identificado un nuevo grupo de cepas del MTBC en restos de seres humanos de Perú (Bos *et al.*, 2014). Estas cepas peruanas son distintas a todos los «ecotipos» adaptados a los seres humanos conocidos hasta el momento, y están estrechamente emparentadas con *M. pinnipedii*; un agente patógeno adaptado a mamíferos marinos pero que también puede causar enfermedad en otros animales y en el ser humano (Cousins *et al.*, 2003). Aparte de la pérdida de la RD9, los análisis filogenéticos han detectado, en los descendientes de este linaje, la presencia de otras alteraciones genéticas que han permitido determinar la posible filogenia del MTBC (fig. 4).

Por su parte, *M. canettii* y las cepas de *M. tuberculosis* «TbD1-intacta» no presentan ninguna de estas deleciones y, por lo tanto, parecen ser descendientes directos de «*M. prototuberculosis*», que pudo haber sido ya un agente patógeno propio de los seres humanos (Brosch *et al.*, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2005).

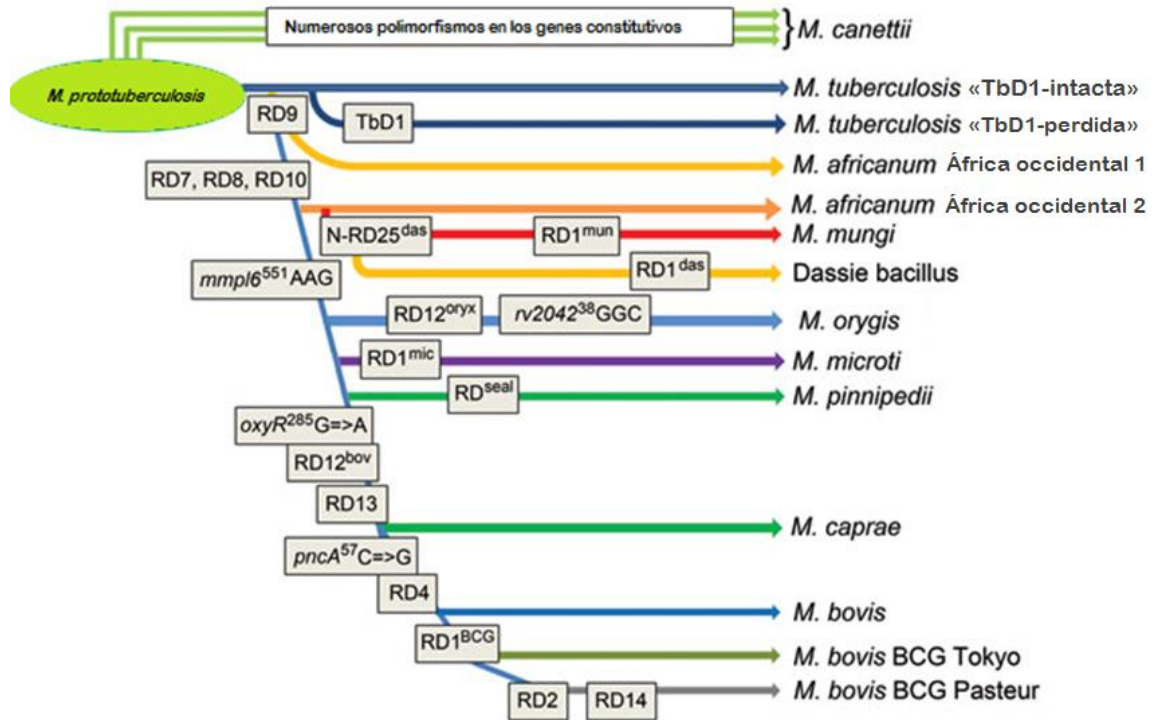


Figura 4: Esquema de la posible filogenia del MTBC. Basada en la presencia o ausencia de las RD y los SNP de varios genes (*mmp16*, *rv2042*, *oxyR* y *pncA*). Los rectángulos en gris indican la pérdida del marcador genético en cuestión o la aparición de una mutación en el gen señalado. Adaptado de van Ingen *et al.* (2012), incluyendo información de Brosch *et al.* (2002), Gutiérrez *et al.* (2005) y Smith *et al.* (2009).

4. Origen y difusión de la tuberculosis humana

En la actualidad, aún no se han resuelto todos los interrogantes que rodean el origen y la evolución de esta enfermedad (Nerlich y Lösch, 2009; Lee *et al.*, 2012). Los datos más recientes sugieren que los cambios genéticos detectados en las diferentes especies del MTBC no sucedieron aisladamente en cada una de ellas, sino que resultaron de acontecimientos genéticos antiguos e irreversibles ocurridos en un progenitor común que habría dado origen a las micobacterias que actualmente forman este complejo (Brosch *et al.*, 2002; Baker *et al.*, 2004; Gutiérrez *et al.*, 2005; Mostowy y Behr, 2005; Filliol *et al.*, 2006; Gagneux y Small, 2007; Hershberg *et al.*, 2008; Wirth *et al.*, 2008; Comas *et al.*, 2013; Coscolla y Gagneux, 2014).

Por otro lado, estos hallazgos contradicen la teoría, predominante hasta hace algunos años, de que *M. tuberculosis* evolucionó a partir de *M. bovis* durante la domesticación de los animales (Cockburn, 1963; Steinbock, 1976). Esta hipótesis se basa en la capacidad que presenta *M. bovis* de causar enfermedad en diversas especies de mamíferos, incluyendo los seres humanos, y la amplia variedad de hospedadores que tiene con respecto a *M. tuberculosis* (Hershberg *et al.*, 2008); presuponiéndose que con el paso del tiempo se produjo la adaptación específica al huésped humano de un agente patógeno propio de animales (Stead *et al.*, 1995). No obstante, los análisis comparativos de secuencias genómicas y los estudios de genética de poblaciones demostraron que era poco probable que *M. tuberculosis* surgiera directamente del actual agente etiológico de la TB bovina (Brosch *et al.*, 2002; Mostowy *et al.*, 2002).

Esto fue posteriormente confirmado con la secuenciación completa del genoma de *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998) y *M. bovis* (Garnier *et al.*, 2003). De este modo, se pudo observar que el genoma de *M. bovis* es ligeramente menor (98.5 %) y ha sido objeto de 11 deleciones respecto a *M. tuberculosis* (Donoghue, 2011). Teniendo en

cuenta que un organismo clónico, como *M. tuberculosis*, no puede reparar deleciones de ADN cromosómico por recombinación, se puede asumir que *M. bovis* se originó a partir de un ancestro común con un genoma más grande que, a su vez, es genéticamente más parecido a *M. tuberculosis* (Smith *et al.*, 2009). Por tanto, las evidencias encontradas hasta el momento sugieren que fueron los seres humanos los que transmitieron la TB a los animales y no al revés (Gibbons, 2008; Wirth *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2009).

Esta última observación también parece demostrar que la TB humana existía antes del Neolítico (Gagneux, 2012). Más aún si se confirma la sospecha de TB en el fósil de *Homo erectus* hallado en Turquía (Kappelman *et al.*, 2008; Roberts *et al.*, 2009). En cualquier caso, las evidencias disponibles hasta ahora sugieren que la TB humana se originó en el Este de África y desde allí se propagó hasta Europa, Asia y el resto del continente africano, siguiendo las rutas de migración humana, hace unos 70000 años (Hershberg *et al.*, 2008; Wirth *et al.*, 2008; Comas *et al.*, 2010; Gagneux, 2012; Comas *et al.*, 2013).

Un estudio realizado por Gutiérrez *et al.* (2005) con aislados de *M. canettii*, y otras variantes lisas, propone que el MTBC se originó en África. Dicho trabajo mostró una notable diversidad genética en estas cepas por el continuo intercambio horizontal de genes, lo que indicaría que podrían ser representantes de «*M. prototuberculosis*» (Brisse *et al.*, 2006; Smith, 2006). *M. canettii*, un miembro muy peculiar del MTBC, ha sido aislado en muy pocos casos de TB y, curiosamente, la gran mayoría de los pacientes vivían en el Cuerno de África o habían pasado algún tiempo en esa zona antes de desarrollar la enfermedad (Fabre *et al.*, 2010).

El origen africano de la TB humana estaría también apoyado por el hecho de que África es la única región del mundo donde se pueden encontrar los seis principales

linajes¹² del MTBC adaptados a los seres humanos (Gagneux y Small, 2007; Hershberg *et al.*, 2008). Además, recientemente se ha identificado un nuevo linaje filogenético de *M. tuberculosis* (linaje 7) fuertemente asociado también con el Cuerno de África (Firdessa *et al.*, 2013). Hasta el momento, este nuevo linaje solo se ha aislado en pacientes de Etiopía o en inmigrantes cuyo país de origen está en el Cuerno de África. El linaje 7 («Etiopía») tiene un gran interés evolutivo, ya que representa una rama filogenética intermedia entre los linajes «ancestrales» (TbD1-intacta) y «modernos» (TbD1-perdida) de *M. tuberculosis* (Brosch *et al.*, 2002; Hershberg *et al.*, 2008; Comas *et al.*, 2010).

Por otra parte, el importante crecimiento demográfico que se produjo en Europa, India y Asia oriental en los últimos siglos, proporcionó un nicho ecológico favorable para la expansión clónica de los tres linajes «modernos» del MTBC. Cada linaje se ha asociado con una de esas tres regiones geográficas: el linaje 4 con Europa, el 3 con India y el 2 con Asia oriental. La exploración de nuevos territorios, las conquistas, los intercambios comerciales y los recientes movimientos migratorios han contribuido a la difusión mundial de esos tres linajes «modernos» (Hershberg *et al.*, 2008). Como se puede observar en la figura 5, este escenario evolutivo encaja muy bien con la actual distribución mundial de los siete principales linajes del MTBC adaptados a los seres humanos (Gagneux *et al.*, 2006; Gagneux, 2012; Comas *et al.*, 2013; Coscolla y Gagneux, 2014).

Todo este debate sobre el origen y la evolución de la TB y los miembros del MTBC, que han infectado a los seres humanos durante milenios, nos sirve para considerar que la prolongada relación entre el huésped y el agente patógeno ha podido

¹² Cuatro linajes de *M. tuberculosis* (linaje 1-«Océano Índico»; linaje 2-«Asia oriental»; linaje 3-«India-África oriental»; linaje 4-«Euro-americano») y dos de *M. africanum* (linaje 5-«África occidental 1»; linaje 6-«África occidental 2»).

favorecer que exista una «coevolución»¹³ entre ambos (Comas *et al.*, 2013); de tal manera que el desarrollo actual de la enfermedad pueda estar influenciado por este hecho.

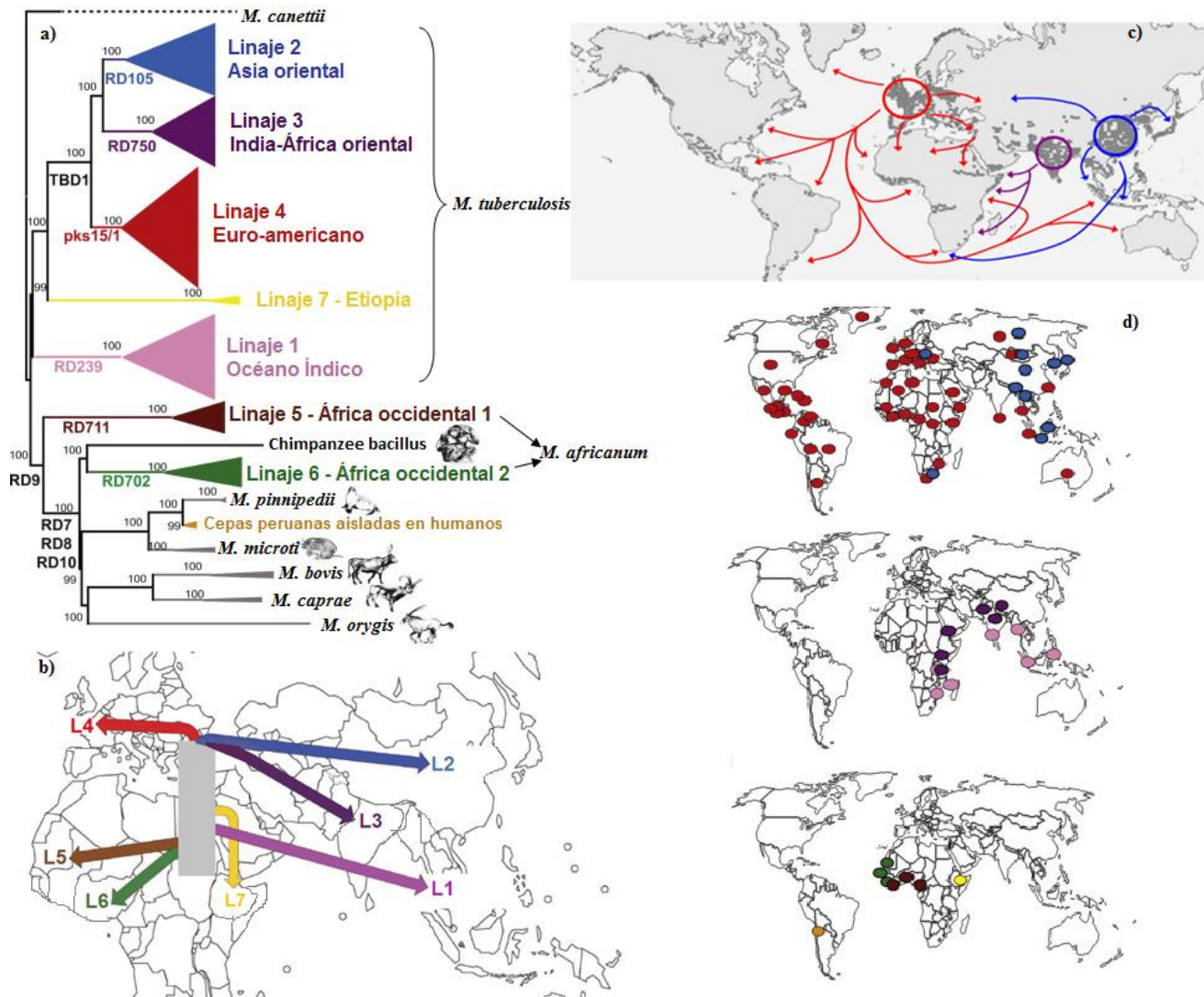


Figura 5: Filogeografía global de los siete principales linajes del MTBC adaptados a los seres humanos [a) Filogenia más probable del MTBC. b) Difusión de esos linajes dentro y fuera de África. c) Expansión de los tres linajes «modernos» desde Europa, India y Asia oriental (en rojo, púrpura y azul respectivamente) al resto del mundo. d) Distribución geográfica de los siete linajes adaptados a los seres humanos del MTBC; los puntos de colores representan el linaje dominante en cada país]. Adaptado de Coscolla y Gagnuex (2014), incluyendo información de Gagneux *et al.* (2006), Hershberg *et al.* (2008), Comas *et al.* (2013) y Bos *et al.* (2014).

¹³ La coevolución entre el huésped y el agente patógeno se caracteriza por los cambios de adaptación recíproca que se producen en las especies que interactúan (Woolhouse *et al.*, 2002).

5. Patogénesis de la tuberculosis

Robert Koch identificó al agente etiológico de la TB hace más de un siglo, y desde entonces ha habido un enorme progreso en el conocimiento de la enfermedad. A pesar de todo, continúan sin esclarecerse cuestiones centrales sobre su patogénesis que resultan claves para seguir avanzando en la lucha contra esta pandemia. Por este motivo, precisar cómo se establece la infección; conocer cuáles son los factores determinantes de una respuesta inmunitaria que, en la mayoría de los individuos, restringe la multiplicación bacteriana y evita la enfermedad activa y, por consiguiente, la transmisión; averiguar por qué el sistema inmunitario deja de contener la infección, así como determinar los cambios que se producen en las personas que desarrollan la enfermedad activa; nos ayudaría a comprender mejor el origen y desarrollo de la TB. A la vez que tendría importantes repercusiones prácticas en la búsqueda de nuevos fármacos y vacunas que contribuyan a su control (Philips y Ernst, 2012). Para intentar hallar una posible respuesta a alguno de estos interrogantes, puede que no resulte del todo desacertado retomar la hipótesis de la coevolución entre el huésped y el agente patógeno, con la que concluimos el apartado anterior. Siguiendo esa tendencia, Gagneux (2012) sugiere que la mayor parte de esta historia de la evolución del MTBC junto al ser humano se habría producido durante la época en la que el hombre era cazador-recolector, cuando las poblaciones humanas eran pequeñas. Las enfermedades humanas más antiguas¹⁴, a menudo se caracterizan por una progresión lenta, en ocasiones, con reactivación después de muchos años de infección latente. Este escenario reflejaría la adaptación de los agentes patógenos a la baja densidad de población que existía en aquellos grupos nómadas de cazadores-recolectores (Blaser y Kirschner, 2007).

¹⁴Dolencias que tendrían entre 10000-500000 años de antigüedad, como las causadas por *M. tuberculosis*, *Salmonella typhi* o el virus varicela-zóster. Más de 500000 años: *Helicobacter pylori*, *Bacteroides* spp. (Blaser y Kirschner, 2007)

En el lado opuesto se situarían las denominadas: «enfermedades epidémicas multitudinarias»¹⁵ (*crowd epidemic diseases*), que se producen localmente como una breve epidemia y, al tratarse por lo general de procesos agudos y muy virulentos, solo son capaces de persistir en grandes poblaciones (Wolfe *et al.*, 2007). La alta densidad de población es necesaria para aumentar la probabilidad de transmisión y reducir el riesgo de extinción de los agentes patógenos por el agotamiento de los hospedadores susceptibles (Comas *et al.*, 2013).

La TB humana tiene, por lo tanto, características propias de una «enfermedad epidémica multitudinaria», dado que es capaz de causar la muerte de hasta el 50 % de los individuos afectados cuando se deja sin tratar y, además, ha desarrollado un mecanismo de transmisión¹⁶ adaptado a comunidades densamente pobladas (Comas *et al.*, 2013). Aunque también muestra un patrón de progresión crónico, con fases de latencia y reactivación, que es característico de una enfermedad más antigua (Barry III *et al.*, 2009). Por ello se ha propuesto que el período de latencia característico de la TB, seguido de la reactivación y consecuente enfermedad activa varias décadas después, normalmente en personas de edad avanzada, podría haber prosperado para permitir a los miembros del MTBC acceder a nuevas generaciones de huéspedes susceptibles y, al mismo tiempo, evitar una situación en la que toda la población se vea afectada por un agente patógeno demasiado virulento (Blaser y Kirschner, 2007).

Por el contrario, la existencia de altas densidades, similares a las encontradas en las ciudades más pobladas de los siglos XVIII y XIX en Europa (Wilson, 1990), podría haber provocado una selección de cepas del MTBC menos «prudentes» (Kerr *et al.*,

¹⁵ Muchas de estas enfermedades surgieron durante el Neolítico, cuando el desarrollo de la domesticación de animales aumentó la probabilidad de transmitir nuevos agentes patógenos al ser humano; al tiempo que las innovaciones agrícolas facilitaron el aumento de la densidad de población, lo cual contribuyó a sostener el ciclo infeccioso (Wolfe *et al.*, 2007).

¹⁶ El bacilo tuberculoso se suele transmitir a otros individuos mediante los aerosoles que genera un enfermo con TB activa al toser, hablar o estornudar; estimándose que para producir la infección es suficiente con que las partículas en suspensión inhaladas contengan entre 1 y 10 bacilos. Estas gotitas pueden persistir en el ambiente durante varias horas; lo que, unido a la baja dosis infectiva característica de este proceso, hace que la transmisión sea extremadamente eficiente (Russell *et al.*, 2009).

2006); ya que en este caso el acceso a huéspedes susceptibles no era un factor limitante. A partir de esta situación, y debido a que los linajes «modernos» del MTBC fueron expuestos a la rápida expansión de la especie humana (Hershberg *et al.*, 2008), se ha revelado que las cepas «modernas» del MTBC tienen mayor poder patógeno y van a provocar períodos de latencia más cortos que las cepas «ancestrales» (Gagneux, 2012). Algunos datos recientes, como la actual tendencia epidemiológica asociada a una mayor difusión de cepas del genotipo «Beijing»¹⁷ (Parwati *et al.*, 2010), la menor respuesta inflamatoria desarrollada contra linajes «modernos» del MTBC que favorece una progresión más rápida de la infección (Portevin *et al.*, 2011) y la disminución de las tasas de enfermedad activa causada por linajes «ancestrales» (de Jong *et al.*, 2008), respaldarían esta predicción.

Parece evidente, por tanto, que el MTBC ha sido capaz de adaptarse a los cambios de las poblaciones humanas con el fin de propagarse de manera más exitosa; utilizando la latencia como parte fundamental de su estrategia de transmisión. De hecho, se ha planteado la posibilidad de que los miembros del MTBC se parezcan en este aspecto al VIH, pues existe la certeza de que su virulencia no ha evolucionado para aumentar la replicación del virus dentro de un individuo, sino para incrementar su probabilidad de transmisión en el colectivo (Fraser *et al.*, 2007).

Además, esta idea se vería reforzada por el hallazgo de Comas *et al.* (2010), al descubrir que, en contra de lo que cabría esperar, los epítomos de células T del MTBC son las regiones más conservadas de su genoma. Este dato sugiere que los epítomos de células T estarían sometidos a una fuerte presión selectiva para ser mantenidos, puesto que podrían desempeñar una función esencial en la difusión exitosa del MTBC. Basándose en sus hallazgos, los autores de la investigación especularon con la

¹⁷ Estas cepas emergentes forman parte de uno de los tres linajes «modernos» del MTBC y representan alrededor del 50 % de los aislamientos en el Este de Asia y al menos el 13 % en todo el mundo. El genotipo Beijing es uno de los más predominantes en la actualidad y hay indicios de que está aumentando en algunas áreas (Parwati *et al.*, 2010).

posibilidad de que la respuesta inmunitaria provocada por estos epítomos de células T en los seres humanos¹⁸, además de ser básica para la supervivencia del individuo, podría ser parcialmente beneficiosa también para el agente patógeno. En otras palabras, en lugar de escapar de la inmunidad del hospedador, al MTBC le interesaría ser reconocido (Gagneux, 2012). Un posible mecanismo por el cual el MTBC podría beneficiarse del reconocimiento de las células T humanas es que las respuestas de estas células son esenciales para que se establezca la infección latente (Comas *et al.*, 2010). Esta suposición se sustenta en el hecho de que la incidencia de TB activa en las personas coinfectadas con el VIH es inversamente proporcional al número de células T CD4⁺ circulantes (Shafer y Edlin, 1996). Las personas con sida que tienen niveles bajos de células T CD4⁺ avanzan rápidamente hacia la enfermedad activa, en lugar de sostener la infección en fase latente durante períodos prolongados (Daley *et al.*, 1991).

Otra prueba determinante por la que al MTBC le interesaría ser reconocido es que la respuesta inmunitaria del hospedador favorece en cierta medida la destrucción del tejido y la formación de cavernas en el pulmón, que, en última instancia, mejora la transmisión (Rodrigo *et al.*, 1997). La frecuencia de lesiones cavernosas en pacientes con TB coinfectados con el VIH se correlaciona directamente con el número de células T CD4⁺ periféricas (Mukadi *et al.*, 1993). Así pues, la teoría de que la inmunidad mediada por las células T contribuye a la formación de cavernas pulmonares se fundamenta en la observación de que los tuberculosos con sida que presentan recuentos de células T CD4⁺ bajos tienen menos probabilidades de sufrir TB cavernosa que los enfermos con recuentos superiores (Kwan y Ernst, 2011). Pese a que todavía se desconocen con exactitud los mecanismos de cavitación pulmonar que intervienen en la

¹⁸ La respuesta inmunitaria adquirida frente a la TB en humanos, primates no humanos y ratones depende de los linfocitos T (North y Jung, 2004). Entre los subgrupos de linfocitos T humanos, las células T CD4⁺ son esenciales para la inmunidad protectora frente al MTBC. El reconocimiento de antígenos extraños por parte de los linfocitos T depende de la unión de fragmentos de péptidos cortos (denominados epítomos) a las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad presentes en la superficie de los macrófagos y las células dendríticas (Comas *et al.*, 2010).

TB, estas observaciones apoyarían la sospecha de que las células T CD4⁺ directa o indirectamente median el daño tisular. Por lo que estos hallazgos ponen de manifiesto que el MTBC se aprovecha de la repuesta inmune adquirida del huésped para aumentar su probabilidad de transmisión (Comas *et al.*, 2010). Si bien, como explicaremos a continuación, algunos trabajos han probado que no solo se beneficiaría de esta, sino que también se podría aprovechar de la formación de granulomas.

5.1. Beneficios biológicos del granuloma tuberculoso

Los granulomas son las lesiones histopatológicas más características de la TB (Philips y Ernst, 2012). Esta estrecha asociación ha provocado que exista un considerable interés por conocer la composición celular del granuloma tuberculoso (fig. 6), así como los mecanismos que intervienen en su formación y mantenimiento (fig. 7).

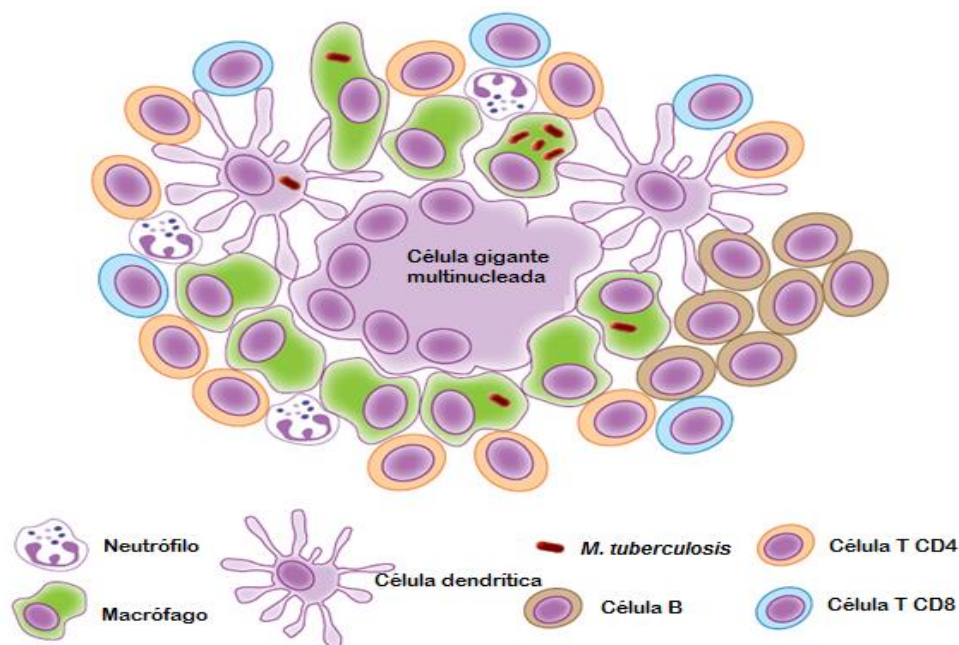


Figura 6: Composición celular del granuloma tuberculoso. Los granulomas pueden presentar diversas morfologías, incluyendo llamativas zonas centrales con necrosis caseosa. Las células representadas se han identificado en granulomas humanos, así como en los de animales infectados experimentalmente. Un hallazgo característico es que solo está infectada una pequeña parte de los macrófagos y las células dendríticas presentes en los granulomas. Adaptado de Philips y Ernst (2012).

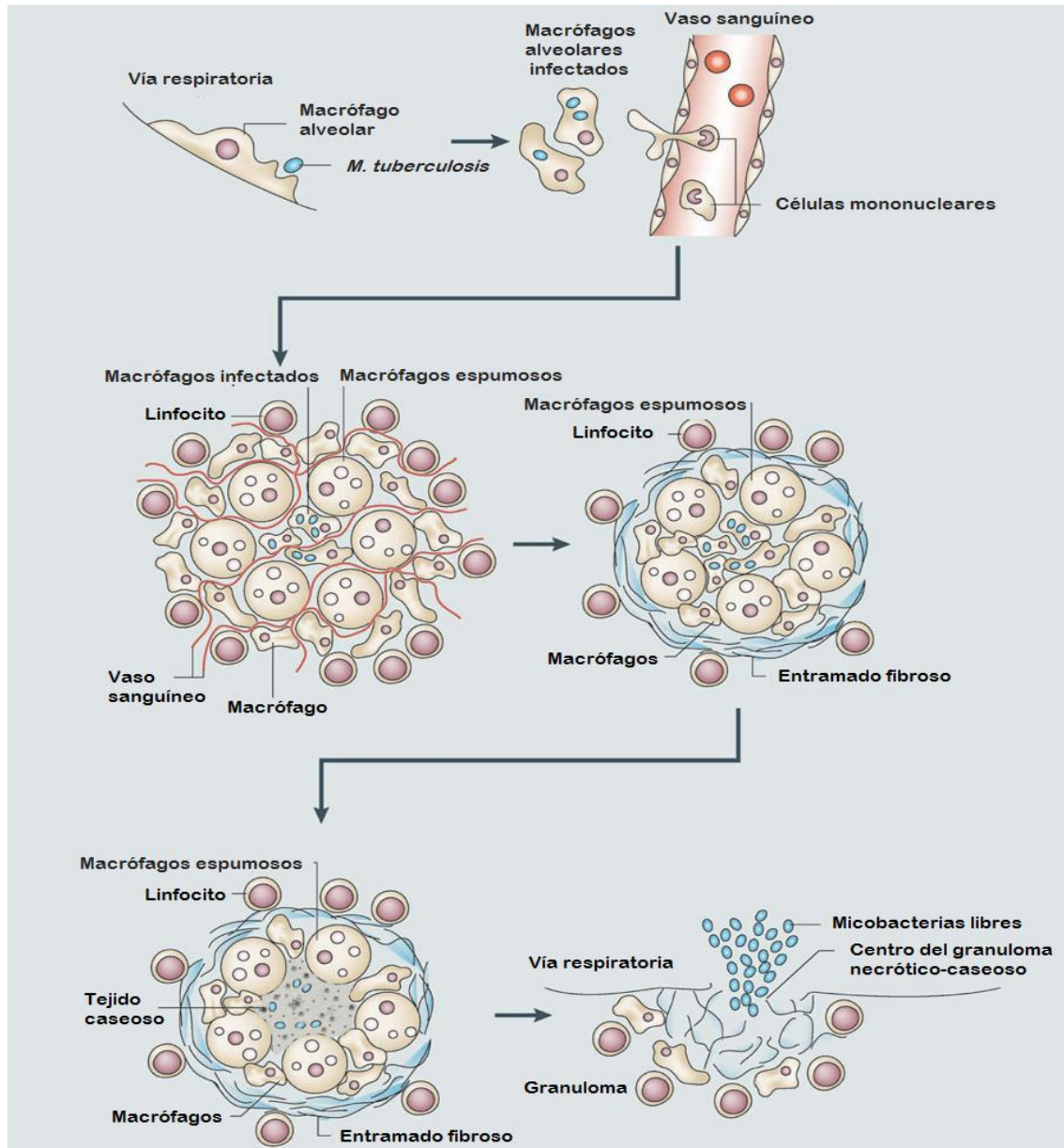


Figura 7: Progresión del granuloma de la TB humana. La infección se inicia tras la inhalación de bacilos viables presentes en las gotitas exhaladas por una persona con TB activa. Una vez en el pulmón, los bacilos son fagocitados por los macrófagos alveolares. Los bacilos fagocitados desencadenan una respuesta inflamatoria que induce a otros macrófagos a invadir el epitelio alveolar. Esta respuesta también conduce a la incorporación de células dendríticas y monocitos de los vasos sanguíneos cercanos que luego se convierten en macrófagos inmaduros. Este agregado celular es probablemente el origen del granuloma; que en su fase inicial, tiene un núcleo de macrófagos infectados envueltos por macrófagos espumosos y otros fagocitos mononucleares, rodeados a su vez por linfocitos. En algún momento algunas bacterias son transportadas, probablemente por las células dendríticas móviles, a los ganglios linfáticos regionales donde se activa a continuación la inmunidad adquirida. Esta respuesta inmunitaria contiene la infección y representa el fin del período de crecimiento rápido de *M. tuberculosis*. A medida que el granuloma madura, se desarrolla una amplia cápsula fibrosa que encierra el núcleo de macrófagos y excluye a la mayoría de los linfocitos del centro de la estructura. Al mismo tiempo que ocurre esta transición, existe una disminución considerable en el número de vasos sanguíneos que penetran en el granuloma. En esta etapa hay un incremento notable en el número de macrófagos espumosos en la cápsula fibrosa. Se ha propuesto que estas células espumosas son las responsables de la acumulación de desechos caseosos en el centro del granuloma, que predice la progresión hacia la enfermedad activa. Además, los macrófagos espumosos también pueden fagocitar bacilos que no se multiplican dentro de esos macrófagos, pero tampoco son eliminados porque han cambiado su metabolismo y no son reconocidos. Cuando la infección progresa, el centro necrótico caseoso del granuloma se licua, formándose cavernas que posibilitan la diseminación de los bacilos hasta las vías respiratorias. El daño del tejido pulmonar provoca el desarrollo de una tos productiva, que facilita la generación de aerosoles infecciosos y la finalización del ciclo de vida del bacilo tuberculoso. Adaptado de Russell *et al.* (2009).

Como era de esperar en una infección crónica, y en contra de lo establecido por el modelo clásico¹⁹, se ha propuesto que los granulomas no solo protegen al hospedador, sino que también benefician al agente patógeno (Philips y Ernst, 2012). Los recientes descubrimientos en este campo apoyan firmemente la hipótesis de que la formación de granulomas favorece la rápida multiplicación bacteriana en la fase inicial de la infección y funciona como una herramienta básica para su difusión sistémica (Davis y Ramakrishnan, 2009).

El desarrollo de un nuevo modelo experimental, que utiliza embriones de pez cebra infectados con *M. marinum*, ha proporcionado una visión única de cómo se inicia la formación de granulomas. Para ello se ha empleado un sistema de vídeo-microscopía que permite el análisis en tiempo real del proceso. Los estudios realizados con este modelo (Davis *et al.*, 2002; Davis y Ramakrishnan, 2009), han revelado que la intensa multiplicación de las micobacterias en fases tempranas de la infección está motivada por un ciclo continuo de muerte celular y posterior fagocitosis de las células infectadas (o de las bacterias liberadas al espacio extracelular) por parte de los múltiples macrófagos que han sido atraídos hasta el granuloma naciente. Los bacilos intracelulares usan el *locus* de virulencia ESX-1/RD1 para atraer hasta el granuloma primario a nuevos macrófagos. Dentro de estos macrófagos los bacilos se vuelven a multiplicar; repitiéndose el ciclo y contribuyendo al crecimiento bacteriano en la zona donde se inició la infección (fig. 8).

Al mismo tiempo, esa lesión inicial promueve la diseminación temprana de la infección mediante la salida de macrófagos infectados para formar otros granulomas, llamados secundarios, en zonas distantes. La migración de los macrófagos infectados se produce por vía hematológica y a través de los tejidos. De este modo, la formación de granulomas secundarios demuestra que los macrófagos constituyen el principal, si no el

¹⁹ Convencionalmente se ha considerado que los granulomas son las estructuras de protección del huésped formadas para contener la infección, al proporcionar un entorno adecuado que permite el control inmunitario de la infección.

único, mecanismo para la diseminación sistémica de los bacilos (Davis y Ramakrishnan, 2009). Este hecho explica también por qué los tuberculosos sin lesiones cavernosas en el pulmón pueden generar aerosoles infecciosos (Behr *et al.*, 1999), aunque en este caso aún no está del todo claro cómo llegan los bacilos al esputo (Cardona, 2009).

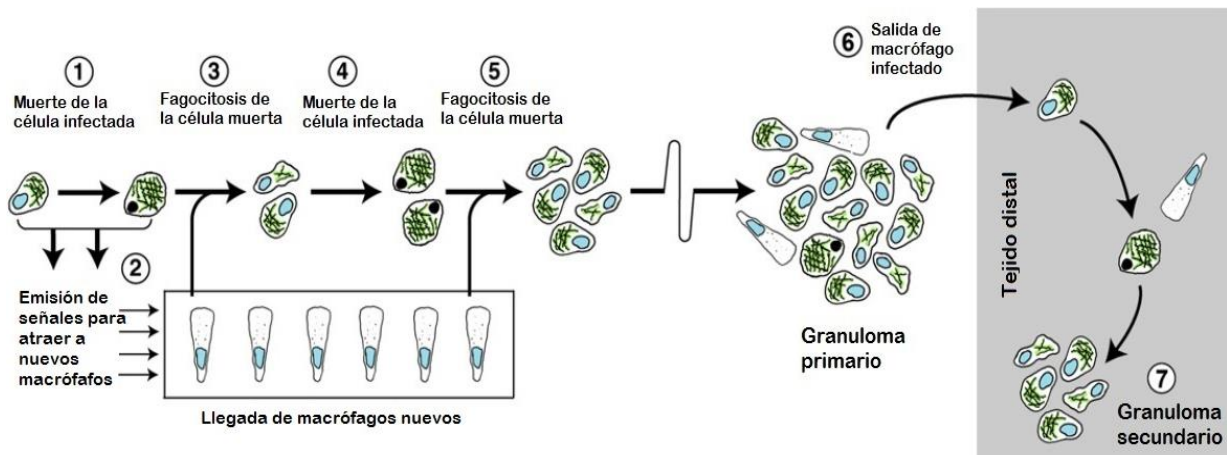


Figura 8: Mecanismo y consecuencias de la formación de granulomas en la fase inicial de la infección. Adaptado de Davis y Ramakrishnan (2009).

Queda por determinar si esos granulomas formados con posterioridad proporcionan también algún beneficio al agente patógeno o son la contraprestación por los favores recibidos con anterioridad. De igual forma, sigue sin concretarse si es la inmunidad del hospedador, suficiente para detener pero no erradicar el crecimiento bacteriano, o si, alternativamente, es la estrategia de evasión y persistencia frente a la respuesta inmunitaria de las bacterias, la responsable del establecimiento y continuidad de los granulomas (Philips y Ernst, 2012).

5.2. Necrosis, licuefacción y cavitación: claves en la persistencia y transmisión del bacilo tuberculoso

Que *M. tuberculosis* es un parásito bacteriano intracelular facultativo está fuera de cualquier debate actual. Tampoco se discute que la fase intracelular es imprescindible para que la bacteria (o grupo de bacterias), tras infectar a una nueva víctima, se multiplique en el interior de los macrófagos y con ello aumente su probabilidad de transmisión. Sin embargo, recientemente se ha propuesto una nueva teoría sobre la patogénesis de la TB que reclama mayor protagonismo para la fase extracelular en el desarrollo de la infección tuberculosa (Orme, 2014). Ian Orme, probablemente el científico vivo que más ha trabajado en modelos experimentales de TB, sostiene que *M. tuberculosis* puede ser igualmente considerado como un agente patógeno extracelular. En su hipótesis expone que un bacilo en el interior del macrófago de un granuloma no puede infectar a la siguiente víctima; ya que, según él, esto solo puede lograrlo un bacilo extracelular que resida en un tejido necrótico. En ese ambiente extracelular, los bacilos persisten y esperan pacientemente a que se produzca la cavitación para poder escapar (fig. 9). Asimismo señala que el mecanismo esencial para la transmisión de *M. tuberculosis* es la necrosis.

Hasta ahora, en la mayoría de los modelos, la generación de necrosis se considera como un punto final. Orme, en cambio, no está de acuerdo con este axioma, y estima que la degeneración del tejido por muerte de sus células es el verdadero punto de partida. Según este, cuando un bacilo entra en los pulmones y comienza a residir dentro de un macrófago alveolar, su fin último es causar un proceso que conduzca a la necrosis; puesto que solo a través de este fenómeno el tejido pulmonar puede ser destruido y el bacilo puede ser exhalado y transmitido.

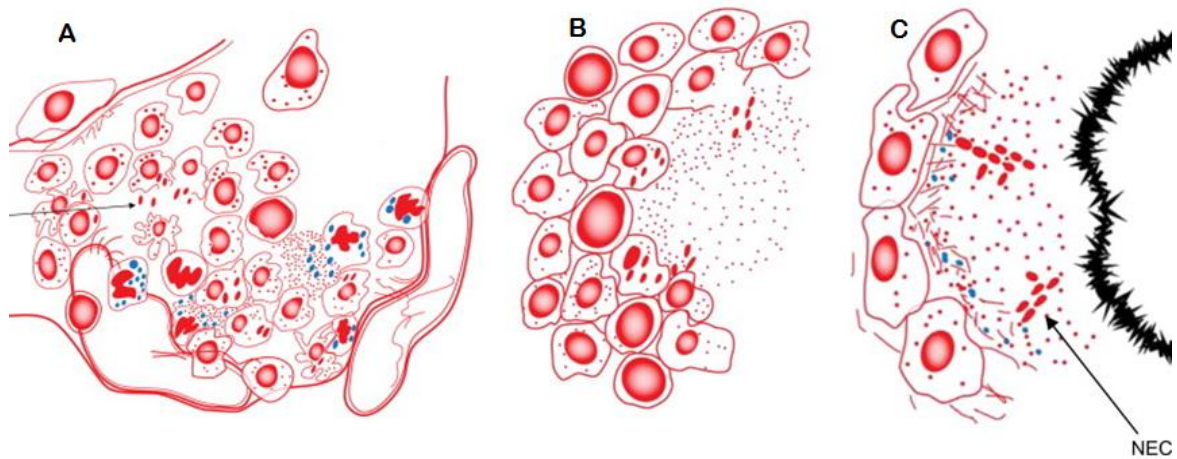


Figura 9: Evolución del foco infeccioso hasta la necrosis del tejido y la calcificación de la lesión. La infección inicial desencadena una aglomeración considerable de células inmunes que es responsable de la formación de la lesión inicial o foco infeccioso [A]. En la mayoría de los casos, la inmunidad innata, fundamentalmente a través de los macrófagos, consigue destruir a las bacterias. Pero cuando el bacilo logra sobrevivir (las micobacterias han desarrollado mecanismos para inhibir la maduración del endosoma e impedir la unión del fagosoma con el lisosoma), se multiplica y son los macrófagos los que mueren; produciéndose la salida de bacilos al espacio extracelular [flecha]. Esos bacilos son fagocitados por las células recién llegadas, en su mayoría macrófagos inmaduros que son incapaces de matar a la bacteria, repitiéndose el proceso y amplificándose. En este punto, se crean pequeños focos de necrosis (visible en los pulmones de cobayas a los 5-7 días) y la lesión comienza a tomar la apariencia clásica del granuloma tuberculoso [B]. Las pequeñas áreas de necrosis se han unido formando una estructura central alrededor de la cual se sitúan los componentes celulares del granuloma. Dicho daño crea inflamación y esto atrae a los neutrófilos, células que pueden ser claves durante todo el proceso. Algunas bacterias probablemente son destruidas en este momento, por la activación de los macrófagos mediante interferón-gamma que desencadena una acidificación y un incremento de los radicales de oxígeno y de nitrógeno en el interior del fagosoma. Pero otras salen de los macrófagos que han muerto, por lo que se convierten en agentes patógenos extracelulares. Los bacilos se adaptan a sobrevivir en la zona necrótica formando agrupaciones extracelulares o NEC (*Necrosis-associated Extracellular Cluster*). Se cree que en los seres humanos estas lesiones necróticas destruyen el tejido pulmonar y crean cavernas; esto no suele ocurrir en modelos experimentales con cobayas, aunque sí se puede observar cuando en estos experimentos se emplean cepas muy virulentas (como las del genotipo Beijing). En ese momento los bacilos supervivientes que persisten en el foco de necrosis cesan la multiplicación (para que no puedan ser detectados), modifican su metabolismo para responder a la situación de estrés provocada por la respuesta inmunitaria y se someten a adaptaciones importantes, que probablemente incluyen cambios en su pared celular que los hace muy difíciles o imposibles de ver con las tinciones tradicionales. Es probable que en este punto ocurran profundas alteraciones en la expresión de genes de *M. tuberculosis*. Durante esta etapa la lesión muestra calcificación [borde representado en negro] que permite aislar físicamente los NEC persistentes en el núcleo necrótico [C]. Adaptado de Orme (2014).

La destrucción del tejido pulmonar en la TB humana es tan grande que la lesión característica en pacientes adultos es la caverna (Grosset, 2003). Esto significa que al proceso necrótico le han seguido la licuefacción del tejido y, finalmente, la cavitación; con el drenaje de la materia tuberculosa hacia el árbol bronquial (Vilaplana y Cardona, 2014). Pero... ¿cómo se llega hasta ese estado?

La teoría clásica sobre la patogénesis de la TB presenta a las bacterias dentro de los macrófagos en estado de latencia, llegando un momento en que «despiertan» y se vuelven a multiplicar; por lo que se reactiva la infección y se desencadena la enfermedad. En contraposición, algunos modelos recientes sugieren que los bacilos persistentes sobreviven en agrupaciones extracelulares asociadas a zonas de necrosis, dentro de unas estructuras organizadas semejantes a una «biopelícula»²⁰. Para describir a estas agrupaciones bacterianas se ha propuesto el término: *Necrosis-associated Extracellular Cluster* o NEC (Orme, 2011). Aunque todavía es rechazado por muchos autores, en especial por aquellos que defienden la idea clásica de infección latente, en la actualidad no hay duda de que, en condiciones *in vitro*, *M. tuberculosis* puede formar «biopelículas» (Ojha *et al.*, 2008; Pang *et al.*, 2012).

Consecuentemente, la pregunta que surge es si algo similar puede suceder en un individuo vivo. Los nuevos modelos plantean la posibilidad de que la zona de necrosis residual, que contiene los NEC supervivientes, se comprima sustancialmente por el proceso de calcificación. Esto hace que los NEC sean empujados hacia el borde de la lesión, cerca de espacios aéreos intactos. De alguna manera, los bacilos son capaces de sentir el aumento local de la presión parcial de oxígeno y comienzan a multiplicarse; pudiendo ser este el primer paso en la reactivación de la infección. Una vez en el borde de la lesión, la presencia del NEC hace que se active la inflamación local; lo cual provoca la atracción de macrófagos hasta esa zona. Esos macrófagos generalmente eliminan a los NEC, pero si esto no sucede, las micobacterias pueden establecer un nuevo foco infeccioso y reactivar la infección. Esta situación podría estar produciéndose de manera continua, aunque controlada por la respuesta inmunitaria; y solo se

²⁰ Comunidades complejas de microorganismos que crecen adheridos a una superficie en la que las células se mantienen unidas gracias a una matriz extracelular que ellos mismos han sintetizado (Davey y O'Toole, 2000).

desencadenaría TB activa si intervienen factores secundarios como la infección por el VIH, otras infecciones pulmonares, la vejez, etc. (Orme, 2014).

En sintonía con esto último, la «Hipótesis Dinámica» sobre la naturaleza de la infección latente (Cardona, 2009), establece que es necesaria una constante reinfección endógena para que los bacilos persistan en el tejido pulmonar. Debido al continuo recambio celular, se estima que el tiempo medio de vida de un macrófago alveolar es de unos tres meses. Así pues, está claro que el bacilo debe intentar multiplicarse constantemente para evitar su eliminación. Al mismo tiempo, el drenaje incesante en el fluido alveolar de macrófagos espumosos cargados de bacilos (en estado «no multiplicativo») desde el granuloma hacia el árbol bronquial permite la continua reinfección; dado que los aerosoles generados son nuevamente inhalados por el paciente y los bacilos regresan a una región diferente del pulmón, donde se establece un nuevo foco infeccioso. Este proceso de reinfección endógena tiene como finalidad el progreso de la lesión hacia la licuefacción y posterior cavitación (Vilaplana y Cardona, 2014).

Un estudio reciente en el que se utilizó un modelo experimental que imita la evolución de la lesión tuberculosa durante la enfermedad activa en adultos inmunocompetentes, desde la necrosis caseosa hasta la licuefacción (Marzo *et al.*, 2014), mostró que las lesiones individuales aumentaron su tamaño de forma exponencial gracias a la atracción masiva de neutrófilos. Los autores observaron que la entrada rápida y en gran cantidad de neutrófilos en la lesión era la clave para generar la necrosis central y subsiguiente licuefacción. Por lo que determinaron que la licuefacción es la consecuencia de una respuesta inflamatoria excesiva, pero no es el origen del crecimiento extracelular de los bacilos. En cambio, establecieron que la excesiva infiltración de neutrófilos sí favorece el crecimiento extracelular de las bacterias. Tal hallazgo es coherente con la hipótesis propuesta por Orme (2014). Estos datos sugieren, por lo tanto, que la inflamación puede ser un factor clave en la progresión hacia la TB

activa (Marzo *et al.*, 2014). Curiosamente, este fenómeno ya había sido descrito en el siglo XIX por Laënnec, quien afirmó que las lesiones cavernosas se debían a la intensa respuesta inflamatoria y la fusión de diferentes lesiones (Vilaplana y Cardona, 2014).

En la misma línea, Jacques Grosset, otro de los científicos que más ha trabajado con modelos experimentales de TB, ha destacado que a las bacterias les interesa ablandar el tejido necrótico para permitir la entrada de oxígeno. El alto contenido de oxígeno favorece la intensa multiplicación extracelular de los bacilos tuberculosos en el tejido licuado. Un paciente con cavernas pulmonares, al toser, difunde los bacilos por medio de aerosoles a otras partes del pulmón y al exterior (Grosset, 2003).

Por otro lado, tradicionalmente se ha defendido que la reactivación es la consecuencia de un «evento inmunosupresor» (Smith y Wiegshaus, 1989). Si bien esto es obviamente cierto en el caso de la coinfección por el VIH o el deterioro gradual del sistema inmunitario causado por el envejecimiento, no explica por qué la recaída es frecuente en pacientes que ya han recibido tratamiento con fármacos antituberculosos (Orme, 2014). En este sentido, los nuevos modelos experimentales sugieren que la reactivación se produce desde las inmediaciones de las lesiones primarias residuales (Basaraba, 2008), y se sabe que esta necrosis residual, aunque sea mínima, todavía puede albergar bacilos vivos capaces de desencadenar la enfermedad (Shang *et al.*, 2012). Por tanto, si el modelo presentado por Orme es correcto y se acepta que *M. tuberculosis* puede formar «biopelículas», entonces estas bacterias persistentes son en ese punto extracelulares y, por consiguiente, se encuentran fuera del alcance tanto de la respuesta inmunitaria mediada por las células T como de los medicamentos (Grosset, 2003). Este hecho puede explicar fácilmente la aparente «tolerancia a los fármacos» de las bacterias persistentes en pacientes que ya han sido tratados (Ojha *et al.*, 2008; Orme, 2011).

En definitiva, si se demuestra que los NEC existen en los seres humanos, deberían convertirse en elementos claves de la investigación en el ámbito de la TB; no solo para esclarecer cuestiones centrales sobre su patogénesis que siguen sin respuesta, sino también por las repercusiones prácticas que puedan tener para el desarrollo de nuevos fármacos y vacunas que contribuyan a su control (Orme, 2014).

6. «Tuberculosis latente»: un desafío persistente

En la mayoría de las personas la infección por *M. tuberculosis* se caracteriza por el aislamiento y la contención, ya que el sistema inmunitario es capaz de controlar la multiplicación bacteriana, no hay signos ni síntomas clínicos de la enfermedad y el único indicio de la infección es el desarrollo de una respuesta inmunitaria específica frente a los antígenos de las micobacterias (Philips y Ernst, 2012). Esa respuesta inmunitaria puede ser detectada mediante métodos inmunológicos como la prueba de la tuberculina o el ensayo de liberación de interferón-gamma (Pai *et al.*, 2008). Basándose en la prueba de la tuberculina, se calcula que un tercio de la población mundial tiene una infección tuberculosa latente (Dye *et al.*, 1999). No obstante, se ha cuestionado la correlación entre la positividad de la prueba de la tuberculina y la infección latente (Orme, 2001). Debido a la memoria inmunológica, no es necesario estar infectado con micobacterias vivas para presentar reacción a la tuberculina; puesto que dicha reacción puede ser la huella que ha dejado una infección que ya ha sido totalmente eliminada (Mack *et al.*, 2009).

En una pequeña parte (5-10 %) de las personas infectadas, esa contención falla y se produce la enfermedad activa; ya sea en los dos primeros años desde que tuvo lugar la primoinfección («TB primaria») o más tarde («TB posprimaria») por la reactivación de la infección latente (Lawn *et al.*, 2011). En regiones de baja incidencia de TB como los EE. UU., la mayoría de los pacientes con enfermedad activa son casos de «TB posprimaria» (Lin y Flynn, 2010). En un reciente estudio realizado en ese país, de los 39920 casos de TB notificados durante los años 2006-2008, el 79.7 % se atribuyó a la reactivación del proceso (Shea *et al.*, 2014).

Históricamente, la contribución de la reinfección exógena a la incidencia de la «TB posprimaria» ha sido en gran medida ignorada porque se suponía que el contacto

previo con *M. tuberculosis* proporcionaba una protección sustancial contra la infección secundaria. Sin embargo, ha quedado probado que la reinfección exógena puede ser una fuente importante de «TB posprimaria» en áreas de alta incidencia (Gomez y McKinney, 2004).

En cualquier caso, las personas con infección latente representan el principal reservorio de *M. tuberculosis*. Si tenemos presente que la mayoría de esos individuos no mueren de TB, el mayor peligro reside en la reactivación de la infección y su posterior transmisión, «silenciosa», a los contactos cercanos {{762 Lin,P.G. 2010}}. Con un reservorio formado por 2000 millones de personas, el control de la TB parece una meta difícil de alcanzar. Aún más si cabe, como no logremos encontrar pruebas diagnósticas y tratamientos más eficaces (Esmail *et al.*, 2014). En reconocimiento de esta necesidad, un informe del *Institute of Medicine* de los EE. UU. ya advertía que «la erradicación de la TB no es posible con las herramientas actualmente disponibles» y «es primordial desarrollar un modelo que facilite la comprensión de la infección latente» (National Research Council, 2000).

6.1. Latencia, inactividad, quiescencia, reposo o persistencia: terminología profusa, enigma irresuelto

De forma común, se ha empleado el término «latencia» para definir la fase de la infección en la que el bacilo tuberculoso se mantiene oculto, dormido o aparentemente inactivo, sin que los pacientes manifiesten síntomas. Aunque sigue utilizándose habitualmente, sobre todo en la práctica clínica, cada vez es más frecuente observar cómo en la literatura científica se recurre al concepto de «persistencia» para referirse a la inusual capacidad que presenta *M. tuberculosis* para resistir a los mecanismos de defensa que el ser humano ha desarrollado con el fin de eliminarlo. De hecho, sin

tratamiento antibiótico, la erradicación de la infección tuberculosa es difícil de lograr; algo complicado incluso utilizando medicamentos. La lentitud con la que los fármacos antituberculosos eliminan a *M. tuberculosis* es otra muestra de la habilidad que tiene este microorganismo patógeno para persistir en el hospedador. Los seis meses o más de quimioterapia necesarios para curar la TB han motivado que los investigadores busquen distintas alternativas para acortar la duración del tratamiento (Gomez y McKinney, 2004).

Aparte de ser una cuestión puramente semántica, el hecho de que se hayan reconocido mecanismos de adaptación que permiten a *M. tuberculosis* persistir en el organismo (Pang *et al.*, 2012), contradice la antigua idea de equiparar a esta fase asintomática únicamente con un estado metabólico caracterizado por la ausencia de actividad del agente patógeno. Si convencionalmente se ha asociado a la infección latente de manera simplificada con la contención de bacterias en alguna forma inactiva, el nuevo concepto de latencia contempla otros aspectos (Lawn *et al.*, 2011).

Así pues, en la actualidad se considera más apropiado representar a la TB latente como un proceso de evolución continuo que integra las diferentes respuestas que el sistema inmunitario genera para intentar controlar la infección. En este contexto, la fase de latencia engloba una gran variedad de estados: desde aquellos en los que ha desaparecido por completo la infección hasta los que están incubando la enfermedad con multiplicación de bacterias en forma activa (Barry III *et al.*, 2009; Young *et al.*, 2009; Lin y Flynn, 2010; Esmail *et al.*, 2012; Robertson *et al.*, 2012).

Es evidente que el concepto clásico de TB latente tiene una notable utilidad clínica. La habitual distinción entre enfermedad activa e infección latente, basándose en la presencia o ausencia de signos y síntomas clínicos, ha sido de enorme utilidad para ayudar al médico a decidir el tratamiento más adecuado en cada momento: un solo

fármaco cuando se detecta una infección latente (en países desarrollados, la isoniacida es comúnmente usada en la quimioprofilaxis de la TB) o una combinación de antibióticos cuando existe enfermedad activa; a fin de evitar con ello el desarrollo de resistencia a los medicamentos (Vilaplana y Cardona, 2014).

En cambio, Young, Barry III y sus colegas (2009), consideran que tratar a la infección latente como una entidad homogénea es un error, y potencialmente limita la base para el desarrollo racional de nuevos medicamentos, vacunas y «biomarcadores» asociados²¹. Estos autores piensan que el concepto clásico debe ser reevaluado y quizá reemplazado (o complementado) por una terminología alternativa que delimite con mayor precisión las características biológicas del proceso. En atención a lo cual han propuesto cinco estados diferentes que representan un modelo dinámico que va desde la inmunidad innata hasta la enfermedad clínica (fig. 10).

Este modelo puede facilitar el diseño de mejores estrategias para el descubrimiento de nuevos tratamientos que eviten la reactivación. Además, teniendo en cuenta que aproximadamente el 90 % de los individuos con infección latente nunca desarrollan TB activa (Gomez y McKinney, 2004), este modelo puede ayudar también a dirigir el tratamiento hacia los individuos que realmente tienen un riesgo alto de que la infección progrese a enfermedad, en lugar de tratar a los 2000 millones de individuos que se estima que hay en el mundo con resultados positivos a la prueba de la tuberculina (Barry III *et al.*, 2009). Sería muy útil que ese 10 % de individuos con alto riesgo de presentar TB clínica fuese identificado antes de que se produjese la reactivación, para poder tratarlos y, de este modo, poder reducir la transmisión. La identificación y selección de este grupo será una importante estrategia en el camino hacia la erradicación

²¹ Los «biomarcadores» tienen gran valor tanto en la práctica clínica para modificar el tiempo y el esquema del tratamiento en TB, como en los ensayos clínicos para evaluar nuevos fármacos o vacunas (Guio *et al.*, 2011).

de la TB; aunque para conseguirlo, será preciso desarrollar técnicas de diagnóstico que sustituyan a la anticuada prueba de la tuberculina (Esmail *et al.*, 2014).

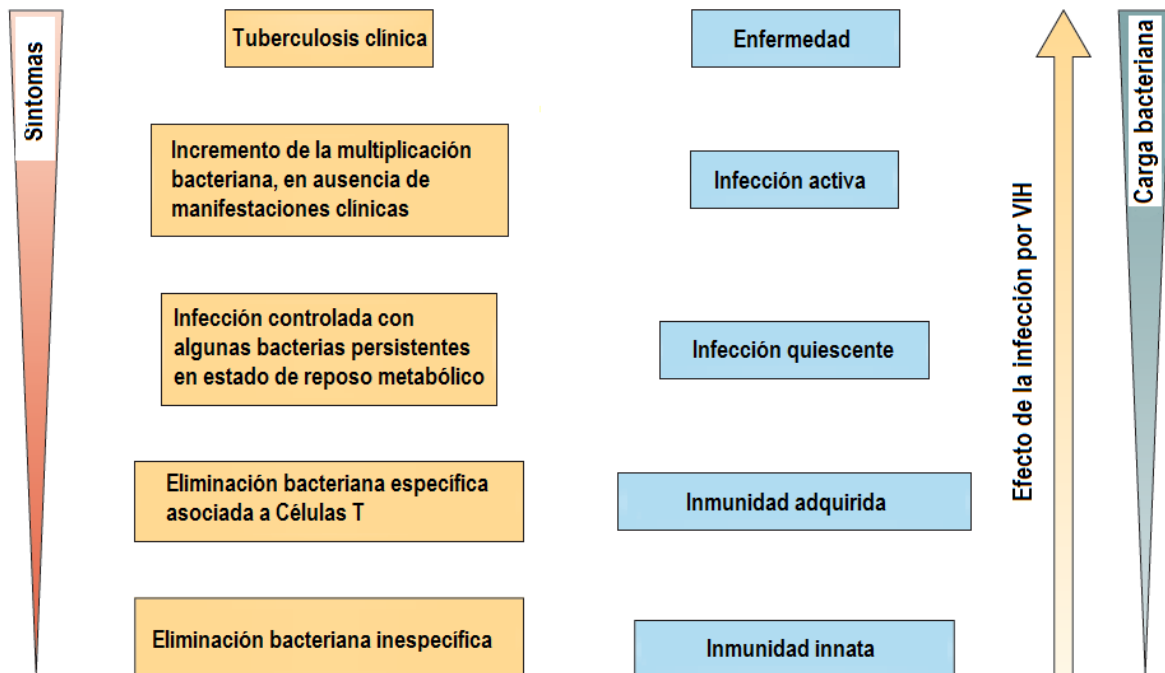


Figura 10: Modelo evolutivo de la infección tuberculosa. Después de la exposición a *M. tuberculosis*, la infección puede ser eliminada por la respuesta inmunitaria innata. Si esto no ocurre, el desarrollo de una respuesta inmunitaria adquirida también puede hacer desaparecer por completo la infección. Para referirse a estos estados se ha empleado las expresiones «inmunidad innata» e «inmunidad adquirida», respectivamente. En la mayor parte de los individuos que no sean capaces de eliminar la infección, se va a establecer el control inmunitario de la misma. Estas personas suelen tener resultados positivos en las pruebas inmunológicas y mantienen una carga bacteriana baja. A este estado se le conoce como «infección quiescente» o en reposo. Un cambio posterior en la inmunidad del huésped, provocado por factores inmunosupresores como la infección con el VIH, puede permitir la multiplicación activa del bacilo tuberculoso; lo que conduce a una «infección activa» subclínica. La pérdida del control inmunitario y el posterior aumento de la carga bacteriana, puede originar el desarrollo de los síntomas y la «enfermedad» clínica. Adaptado de Barry III. *et al.* (2009) con información de Young *et al.* (2009) y Lawn *et al.* (2011).

Como venimos reflejando a lo largo de toda la exposición, el desarrollo de la enfermedad resulta de las interacciones entre el huésped, el agente patógeno y el medio ambiente (O'Garra *et al.*, 2013). Mucho se ha investigado sobre la influencia de cada uno de esos tres componentes en la evolución de la TB. Así pues, a partir de modelos experimentales en ratón y los propios conocimientos que se tienen sobre la enfermedad en los seres humanos, por medio de estudios inmunológicos, actualmente se sabe que

las células T CD4⁺ (Flynn y Chan, 2001; North y Jung, 2004; Cooper, 2009), junto con la interleucina-12, el interferón-gamma (Flynn y Chan, 2001; Alcaïs *et al.*, 2005; Cooper, 2009; Alcaïs *et al.*, 2010) y el factor de necrosis tumoral (Flynn *et al.*, 1995; Keane *et al.*, 2001), son fundamentales para controlar la infección por *M. tuberculosis*. Asimismo se ha demostrado que algunas cepas de *M. tuberculosis* tienen mayor poder patógeno que otras (Coscolla y Gagneux, 2010); y que determinados genotipos de *M. tuberculosis* se asocian con polimorfismos en genes de la inmunidad del huésped, que lo hacen más susceptible a padecer la enfermedad. Este hallazgo apoya nuevamente la hipótesis de la coevolución de *M. tuberculosis* y el ser humano (van Crevel *et al.*, 2009). También se sabe que existen factores de riesgo que favorecen el progreso de la enfermedad como son: la infección por el VIH, la edad, el tabaquismo, el alcoholismo, la diabetes mellitus, los tratamientos inmunosupresores, la desnutrición, el hacinamiento, la pobreza en general... (O'Garra *et al.*, 2013). Con todo, seguimos sin poder explicar por qué algunos individuos son capaces de contener, incluso eliminar, la infección, mientras que otros desarrollan la enfermedad activa y presentan diversas manifestaciones clínicas.

7. Manifestaciones clínicas de la enfermedad activa

Las personas con mayor riesgo de desarrollar TB activa pueden agruparse en dos categorías. En el primer grupo están los individuos infectados recientemente, entre los que se incluyen: contactos íntimos de pacientes tuberculosos contagiosos, conversores de la prueba de la tuberculina en los dos años previos, inmigrantes recientes (menos de cinco años desde su llegada) procedentes de países con tasas altas de TB, niños de hasta cinco años de edad, sobre todo en los dos primeros años de vida; así como residentes y empleados de lugares que congregan a pacientes de alto riesgo. En el segundo grupo están los pacientes con condiciones clínicas que aumentan el riesgo de progresión, generalmente por deficiencia del sistema inmunitario, como son los: infectados por el VIH, pacientes con TB previa o lesiones fibróticas no tratadas, individuos con déficit ponderal superior al 5 %, consumidores de drogas por vía parenteral, pacientes tratados con antagonistas del factor de necrosis tumoral, enfermos con tratamiento mantenido con corticoides u otros inmunodepresores; y en general, cualquier situación clínica que provoque una inmunodeficiencia (González-Martín *et al.*, 2010).

Cuando se desarrolla TB activa, la localización de la enfermedad, la gravedad y la resolución del proceso son muy variables. La TB puede desarrollarse en prácticamente cualquier parte del cuerpo, pero en un 60-75 % de los casos se presenta como una afección pulmonar (Esmail *et al.*, 2014), con manifestaciones que pueden variar desde una infiltración leve hasta una enfermedad severa, destructiva y crónica (van Crevel *et al.*, 2002).

Además del pulmón, *M. tuberculosis* puede invadir otros órganos, incluidos ganglios linfáticos, huesos y meninges, y causar una enfermedad extrapulmonar, a menudo asociada a «TB primaria» que es más común en niños y personas inmunodeprimidas (Golden y Vikram, 2005; Cruz y Starke, 2007). En

aproximadamente un 20 % de los casos la TB es extrapulmonar (Peto *et al.*, 2009; Sandgren *et al.*, 2013). Las formas más frecuentes son la ganglionar y la pleural, seguidas de la genitourinaria y la miliar. La TB miliar, caracterizada por la diseminación hematógena de un gran número de micobacterias en todo el cuerpo, es la manifestación de la enfermedad más grave. En el extremo opuesto se sitúa la TB pleural, que puede presentarse de forma aislada o concomitante a una TB pulmonar (van Crevel *et al.*, 2002).

La clínica de la TB pulmonar es inespecífica. Lo habitual es que el paciente presente síntomas de varias semanas de duración; siendo los más frecuentes: tos, expectoración, en ocasiones hemoptoica, sudoración nocturna excesiva y pérdida de peso. Los pacientes también pueden presentar: fiebre, astenia, pérdida de apetito, etc. La disnea se produce en fases avanzadas si hay una destrucción importante del parénquima pulmonar y el dolor torácico es frecuente cuando hay afectación pleural (Brändli, 1998). En la tabla 1 se muestran las manifestaciones más comunes de la TB pulmonar.

	TB primaria	TB posprimaria
Síntomas		
Tos y expectoración		+++
Hemoptisis		+
Sudoración nocturna		++
Pérdida de peso	+	++
Malestar/fatiga	+	++
Dolor torácico	+	+
Signos		
Fiebre	++	++
Estertores		+
Sonidos de roce pleural		+
Radiografía de tórax		
Afectación apical		+++
Cavitación		+++
Afectación de bases pulmonares	++	
Ensanchamiento de hilios pulmonares	++	

Tabla 1: Presentación clínica de la tuberculosis pulmonar.
+++ : Comunes (> 50 %); ++ : menos comunes; + : casos aislados. Adaptado de Brändli (1998).

Por su parte, las manifestaciones de la TB extrapulmonar dependen del órgano afectado. Los signos y síntomas más frecuentes en las distintas afectaciones extrapulmonares se exponen en la tabla 2 (Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre el Diagnóstico, el Tratamiento y la Prevención de la Tuberculosis. Centro Cochrane Iberoamericano, coordinación., 2009).

	Locales	Sistémicos
TB pleural	<ul style="list-style-type: none"> - Dolor torácico de tipo pleurítico. - Derrame pleural unilateral, exudativo, linfocitario. 	<ul style="list-style-type: none"> - Febrícula. - Disnea.
TB ganglionar	<ul style="list-style-type: none"> - Adenopatías preferentemente cervicales y supraclaviculares. - Inflamación, dolor, ulceración y supuración de nódulos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Síndrome constitucional en personas con infección por el VIH.
TB ósteoarticular	<ul style="list-style-type: none"> - Osteomielitis, artritis. - Dolor y abscesos en tejidos próximos. - Espondilitis y espondilodiscitis. - Compresión radicular y parapleja. - Desviación de la columna y deformidades osteoarticulares. 	<ul style="list-style-type: none"> - Síndrome constitucional poco frecuente.
TB del sistema nervioso central (meningitis, tuberculomas)	<ul style="list-style-type: none"> - Cefalea, signos meníngeos. - Afectación de pares craneales. - Hidrocefalia. - Trombosis de vasos cerebrales e ictus. - Hemiparesia, monoparesia. - Extrapiramidalismo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Fiebre. - Anorexia, vómitos, malestar, cambio de carácter. - Confusión, estupor, coma. - Crisis convulsivas.
TB pericárdica	<ul style="list-style-type: none"> - Pericarditis exudativa o constrictiva. - Taponamiento pericárdico. 	<ul style="list-style-type: none"> - Síndrome constitucional. - Hipotensión. - Disnea.
TB genitourinaria	<ul style="list-style-type: none"> - Piuria, hematuria, disuria, polaquiuria, con cultivos convencionales negativos. - Dolor cólico. - Nefritis intersticial. - Epididimitis, hidrocele, prostatitis. - Metrorragia, amenorrea. 	<ul style="list-style-type: none"> - Poco frecuentes.
TB gastrointestinal	<ul style="list-style-type: none"> - Masa abdominal, ascitis. - Úlceras y sangrado digestivo. - Oclusión intestinal. 	<ul style="list-style-type: none"> - Fiebre, pérdida de peso, diarrea.
TB miliar	<ul style="list-style-type: none"> - Predominan los síntomas sistémicos. - Puede haber meningitis concomitante, sobre todo en niños. 	<ul style="list-style-type: none"> - Malestar, fiebre, anorexia, pérdida de peso, sudoración nocturna, debilidad. - Raramente, choque y distrés respiratorio agudo.
TB cutánea	<ul style="list-style-type: none"> - Nódulos recurrentes con signos inflamatorios. 	

Tabla 2: Signos y síntomas de la tuberculosis extrapulmonar. Fuente: Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre el Diagnóstico, el Tratamiento y la Prevención de la Tuberculosis. Centro Cochrane Iberoamericano, coordinación (2009).

La TB extrapulmonar a menudo se percibe más como una peculiaridad clínica que como un verdadero problema de Salud Pública. El hecho de no contribuir significativamente a la transmisión de la enfermedad puede ser el origen de su escasa relevancia en los planes de salud. Sin embargo, puede causar importantes complicaciones y dejar secuelas de por vida en los pacientes que la padecen (Sandgren *et al.*, 2013). Además, la TB extrapulmonar puede aparecer en más de un 50 % de los pacientes con sida. En estos casos, la enfermedad se disemina y progresa rápidamente. Los pacientes suelen presentar adenopatía visceral y abscesos en órganos. El resultado a la prueba de la tuberculina en la mayoría de estos enfermos es negativo²². La respuesta al tratamiento antituberculoso es favorable y similar a la de pacientes sin infección por el VIH, aunque las reacciones adversas a los medicamentos son más frecuentes en los pacientes con sida (Golden y Vikram, 2005).

7.1. Determinantes del fenotipo clínico

Se sospecha que tanto el linaje filogenético del MTBC como el genotipo del huésped pueden determinar los fenotipos clínicos de la TB. En los últimos años, son numerosos los trabajos que han tratado sobre esta materia (Coscolla y Gagneux, 2010; Newport, 2013). A pesar de todo, se desconoce la importancia relativa de cada uno de estos determinantes genéticos, así como el grado de interacción entre ambos. Además, en muchos casos los resultados presentados en esos estudios han sido contradictorios. Tal discrepancia quizá pueda deberse a la dificultad que entraña interpretar correctamente la asociación entre los diferentes linajes filogenéticos con individuos de etnias y orígenes geográficos también diversos. Correlación en la que, por otra parte,

²² La baja reactividad de la prueba de la tuberculina limita su uso clínico en pacientes inmunodeprimidos con TB extrapulmonar (Kim *et al.*, 2009).

pueden ser igualmente decisivos factores como la edad, el sexo, el estado inmunitario, el tabaquismo, los niveles de vitamina D, etc. (Pareek *et al.*, 2013).

La caracterización genética de los aislados clínicos ha permitido identificar siete linajes principales en el MTBC que epidemiológicamente se asocian con regiones geográficas distintas (Gagneux *et al.*, 2006; Reed *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2010; Evans *et al.*, 2010; Firdessa *et al.*, 2013). Se ha comprobado también que los diversos linajes filogenéticos pueden provocar diferentes respuestas inmunes en el huésped (Coscolla y Gagneux, 2010). Así por ejemplo, el linaje Asia oriental (al que pertenece el genotipo Beijing) induce niveles más bajos de citoquinas inflamatorias (Portevin *et al.*, 2011), al tiempo que exhibe un mayor crecimiento intracelular (Li *et al.*, 2002).

Por más que pudiera esperarse que las diferencias observadas en la respuesta inmunitaria del huésped en experimentos *in vitro* dieran lugar a distintos fenotipos clínicos también en condiciones naturales, y que, a su vez, estos patrones clínicos pudieran ser asociados con los diversos grupos étnicos (Te Beek *et al.*, 2006; Peto *et al.*, 2009), aún no se ha podido corroborar. De ahí que la influencia de la diversidad genética del bacilo tuberculoso en los fenotipos clínicos de la TB continúe sin determinarse con exactitud (Pareek *et al.*, 2013).

Una excepción notable podría ser el genotipo Beijing que, en ciertos grupos étnicos, se ha relacionado con un curso clínico más agresivo (Thwaites *et al.*, 2008) y formas extrapulmonares o extratorácicas (Kong *et al.*, 2007; Hesselning *et al.*, 2010). En concreto, en el estudio llevado a cabo en Arkansas por Kong *et al.* (2007), se observó una asociación estadísticamente significativa entre la infección por cepas del genotipo Beijing y la TB extratorácica²³. Según los autores de la investigación, estas cepas pueden tener algunas características biológicas especiales que faciliten el desarrollo de

²³ La TB extratorácica se definió como los casos en los que la enfermedad no se localizó en pulmón, pleura y ganglios linfáticos intratorácicos, con o sin enfermedad concurrente dentro de la cavidad torácica.

formas extratorácicas. Si bien, ellos mismos reconocen las limitaciones de su trabajo, ya que el tamaño de la muestra de pacientes con TB extratorácica infectados con cepas Beijing fue relativamente pequeño (n= 8). Otros estudios no han podido documentar esta relación (Borgdorff *et al.*, 2004; Nicol *et al.*, 2005; Caws *et al.*, 2008; Lari *et al.*, 2009; Svensson *et al.*, 2011; Click *et al.*, 2012; Xing *et al.*, 2012; Sankar *et al.*, 2013). En cambio, algunos de esos trabajos sí han confirmado la asociación de otros linajes del MTBC con TB extrapulmonar (Lari *et al.*, 2009; Svensson *et al.*, 2011; Click *et al.*, 2012).

Por otro lado, un estudio con adultos vietnamitas (Caws *et al.*, 2008) demostró una clara relación entre el linaje de *M. tuberculosis* y el fenotipo clínico, al observar que el desarrollo de TB pulmonar fue significativamente más probable cuando intervenía el linaje Euro-americano. Este hecho sugiere que dicho linaje tiene menor capacidad para provocar la diseminación de la enfermedad y causar TB extrapulmonar. En el mismo sentido, un reciente estudio llevado a cabo en Uganda con aislados clínicos de pacientes con TB ganglionar (Wamala *et al.*, 2014), mostró que los individuos infectados con cepas del genotipo «Uganda», responsables de aproximadamente el 70 % de los casos de TB en ese país (Asiimwe *et al.*, 2008), fueron significativamente menos propensos a presentar adenopatía abdominal que los pacientes infectados con cepas de otros genotipos. Por tanto, en concordancia con lo observado por Caws *et al.* (2008), el genotipo «Uganda», que pertenece al linaje Euro-americano, parece tener un potencial reducido para causar enfermedad extrapulmonar, mientras que muestra una mayor predisposición para producir TB pulmonar. Los resultados de esta investigación apoyan nuevamente la hipótesis de que la diversidad genotípica de *M. tuberculosis* puede tener implicaciones clínicas (Wamala *et al.*, 2014). Asimismo, otro estudio, en este caso realizado en los EE. UU. (Click *et al.*, 2012), evaluó la conexión entre el linaje de *M.*

tuberculosis y el fenotipo clínico de la enfermedad, teniendo en cuenta posibles factores de confusión como el origen geográfico de los pacientes, la etnia, el sexo, la infección por el VIH y la edad. De esta forma, también se encontró una correlación significativa entre el genotipo de *M. tuberculosis* y el fenotipo clínico. Aunque los resultados obtenidos difieren de los presentados en los trabajos a los que acabamos de hacer referencia (Caws *et al.*, 2008; Wamala *et al.*, 2014). En su estudio, Click *et al.* (2012) observaron que el linaje Euro-americano no se relacionó con TB pulmonar sino que se asoció con localizaciones extrapulmonares. Además, establecieron que solo existía una débil correlación entre la presentación clínica de la enfermedad y la etnia.

Por el contrario, Pareek *et al.* (2013) sostienen que la etnia es un poderoso determinante del fenotipo clínico de la TB, con independencia del genotipo micobacteriano implicado en el proceso. Los autores de este trabajo consideran que, a pesar de que los linajes del MTBC pueden asociarse con fenotipos clínicos específicos, la etnicidad parece ser el factor más importante a la hora de determinar la presentación clínica de la enfermedad tuberculosa. Cuando menos en el caso de la etnia originaria del «subcontinente indio» y la enfermedad extrapulmonar o extratorácica (Pareek *et al.*, 2013). En línea con el anterior, otro estudio, realizado también en el Reino Unido (Coussens *et al.*, 2013), demuestra un grado hasta ahora poco apreciado de cómo la etnia influye en el perfil inflamatorio de los pacientes con TB. Coussens *et al.* (2013) consideran que este fenómeno está relacionado con la variedad étnica del huésped y no con la diversidad genética del bacilo tuberculoso.

Si finalmente se confirma que el genotipo del huésped es un factor decisivo en el desarrollo de la TB, puede que, aun sin conocer su verdadera naturaleza, los autores clásicos tuvieran razón. Si recuerdan, al comienzo de esta revisión, concretamente en el apartado titulado «**Historia de la enfermedad**», decíamos que «la escuela

hipocrática consideraba que la tisis pulmonar era una enfermedad hereditaria, en lugar de infecciosa». También señalábamos que en esa misma época ya se sospechaba de la naturaleza infecciosa de la TB. Suposición que quedó finalmente probada cuando Robert Koch logró identificar el agente etiológico. Esto ha motivado que durante mucho tiempo se haya considerado a la TB como una enfermedad puramente infecciosa. Sin embargo, cada vez hay más pruebas que demuestran la existencia de factores genéticos del huésped implicados en el desarrollo de la enfermedad. Pese a ello, aún se desconoce la naturaleza exacta de esas variantes genéticas (Abel *et al.*, 2014). Una muestra de que este proceso patológico puede tener también una importante predisposición mendeliana, es la facilidad con la que algunos niños infectados con *M. tuberculosis* desarrollan formas clínicas graves (Stewart *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos en los últimos años han mostrado que algunos casos de TB grave en niños pueden ser explicados por la presencia de alteraciones heredadas en un solo gen de la inmunidad (Abel *et al.*, 2014). Por tanto, es posible que la teoría de Hipócrates no fuera del todo incierta; y la susceptibilidad a la TB sea en parte hereditaria (Newport, 2013). Pero como se suele decir: «se necesitan nuevos datos, más investigaciones que permitan ampliar nuestros conocimientos sobre estas cuestiones» (Permítannos que no citeamos a ningún autor o estudio en particular, pues probablemente estemos ante la conclusión más repetida en la historia de la literatura científica).

8. Caracterización molecular del complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Los métodos que inicialmente se utilizaron para discriminar entre aislados clínicos del MTBC se basaban en características fenotípicas, como la morfología de las colonias, la susceptibilidad a los fármacos antituberculosos o el fagotipado. La utilidad de estos métodos se ve seriamente limitada por la variabilidad fenotípica de las micobacterias. La discriminación entre cepas en función de sus características bioquímicas y serológicas es aún más infructuosa. Un punto de inflexión en esta materia fue la irrupción y el posterior desarrollo de las técnicas de biología molecular a mediados de la década de 1980 (Jagielski *et al.*, 2014). Desde entonces se han empleado diversos marcadores moleculares para la caracterización genotípica de los miembros del MTBC, que han revelado distintos tipos de polimorfismo genético (Borgdorff y van Soolingen, 2013). Esos marcadores se han usado en métodos que tienen diferentes aplicaciones (tabla 3). Hasta el momento, ninguna de las técnicas ha demostrado ser claramente superior a cualquiera de las otras, debido a que cada una tiene sus propias ventajas, así como ciertas deficiencias o limitaciones. En este sentido, el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (*restriction fragment length polymorphism*, RFLP), con la IS6110 como marcador, ha sido el método más utilizado para la tipificación de aislados de *M. tuberculosis*, por ser muy reproducible y útil para distinguir entre cepas (van Embden *et al.*, 1993); aunque es técnicamente complejo, lento y caro (van Soolingen, 2001). Por el contrario, el espoligotipado (*spacer oligonucleotide typing*, *spoligotyping*) tiene la ventaja de ser simple, rápido y barato; y es una técnica con la que se puede, en gran medida, identificar tanto las especies del MTBC como sus diferentes genotipos, que han sido clasificados en familias (Brudey *et al.*, 2006). No obstante, el RFLP-IS6110 tiene mayor poder de

discriminación que el espoligotipado (Kremer *et al.*, 1999). Por su parte, el análisis del número variable de repeticiones en tándem de múltiples *loci* (*Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis*, MLVA) es un método que cada vez está siendo más utilizado (Lindstedt, 2005), debido a que proporciona una buena discriminación entre las cepas del MTBC, similar a la del RFLP (Mazars *et al.*, 2001); y también puede ser empleado, con resultados satisfactorios, para la determinación de su filogenia (Hill *et al.*, 2012). Si bien, los métodos más adecuados para los estudios filogenéticos son los basados en la detección de las RD y los SNP, ya que son marcadores moleculares menos propensos a manifestar homoplasia²⁴ (Comas *et al.*, 2009; Schürch y van Soolingen, 2012). Con todo, actualmente se considera que la secuenciación completa del genoma (*whole genome sequencing*, WGS) es la técnica de caracterización molecular con mayor poder de discriminación y se espera que en el futuro se convierta en una útil herramienta diagnóstica (Schürch *et al.*, 2010a; Gardy *et al.*, 2011; Walker *et al.*, 2013).

Método – marcador genético	Transmisión	Filogenia	Estabilidad genética
RLFP-IS6110	++++	–	±
Espoligotipado	+	±	++
MLVA	++++	+++	¿?
RD	–	++++	+++
SNP	–	++++	+++

Tabla 3: Idoneidad de los marcadores genéticos o técnica de caracterización molecular en sus diferentes aplicaciones. Adaptado de Borgdorff y van Soolingen (2013).

A continuación se describen los métodos moleculares disponibles en la actualidad para la caracterización genotípica del MTBC, prestando especial atención a las técnicas empleadas para tipificar los aislados incluidos en este trabajo de investigación.

²⁴ Aparición de genotipos idénticos en organismos filogenéticamente no relacionados.

8.1. Análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción

Los primeros intentos de caracterización molecular del MTBC estaban basados en el análisis del ADN bacteriano digerido con diversas endonucleasas de restricción (*restriction endonuclease analysis*, REA). Los fragmentos de ADN resultantes se separaban por electroforesis en geles de agarosa, donde se visualizaba el perfil de bandas obtenido, que era característico de cada cepa (Collins y de Lisle, 1985; Imaeda, 1985; Collins y de Lisle, 1987). Sin embargo, usando el procedimiento original, la sensibilidad del método es bastante limitada. Además, el gran número de bandas que se obtiene cuando se emplean varias enzimas de restricción, hace que la interpretación de los resultados sea difícil (Collins y de Lisle, 1984). Por ello se introdujeron nuevas herramientas moleculares, como las sondas de ácidos nucleicos dirigidas a secuencias repetitivas del genoma bacteriano, con el fin de visualizar solamente aquellos fragmentos de restricción que contienen la secuencia de ADN complementaria a la sonda utilizada. El primer método en el que se aplicó este procedimiento fue el análisis del RFLP, que es, por lo tanto, una combinación entre el REA y un ensayo de hibridación (Jagielski *et al.*, 2014).

En los primeros estudios que utilizaron el RFLP, se indicaba que las cepas de *M. tuberculosis* tenían un grado de diversidad genética considerablemente bajo. No obstante, tal interpretación de los resultados era, en realidad, engañosa, ya que las sondas utilizadas se dirigían a regiones altamente conservadas, y presentaban, por tanto, una baja especificidad (Shoemaker *et al.*, 1986; Ross *et al.*, 1991; Palittapongarnpim *et al.*, 1993). El poder de discriminación de este método aumentó sustancialmente cuando se identificaron y se utilizaron en el diseño de las sondas (Eisenach *et al.*, 1986; Eisenach *et al.*, 1988) las secuencias de inserción (Jagielski *et al.*, 2014). La más conocida y estudiada es la IS6110 (Hermans *et al.*, 1990; McAdam *et al.*, 1990; Thierry

et al., 1990a; Thierry *et al.*, 1990b). Una secuencia que fue reconocida como tal por Thierry y colaboradores en 1990, y que es específica de los miembros del MTBC (Cave *et al.*, 1991). De todas las secuencias de inserción descritas en MTBC, la IS6110 es el marcador genético más importante y ampliamente usado para diferenciar aislados clínicos de *M. tuberculosis*. El grado de polimorfismo de la IS6110 ha posibilitado que durante mucho tiempo se haya considerado al RFLP-IS6110 como la técnica de referencia en las investigaciones epidemiológicas de TB en seres humanos. Sin embargo, los trabajos llevados a cabo con aislados de *M. bovis* han revelado que este miembro del MTBC suele presentar un escaso número de copias de esta secuencia, habitualmente inferior a seis y en un alto porcentaje de los casos una sola copia (Collins *et al.*, 1993; van Soolingen *et al.*, 1993; Aranaz *et al.*, 1998; Kremer *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2004).

La técnica RFLP-IS6110 se realiza siguiendo un protocolo estandarizado (van Embden *et al.*, 1993), en el que tras la extracción del ADN micobacteriano, se realiza la digestión con la enzima de restricción *PvuII*. Posteriormente, los fragmentos resultantes se separan en función de su tamaño por electroforesis en un gel de agarosa. Después de la electroforesis, los fragmentos de ADN separados son transferidos a una membrana de nailon mediante la técnica «Southern blot» (Southern, 1975), donde tiene lugar la hibridación con una sonda complementaria al extremo 3' de la IS6110, que previamente ha sido marcada. De esta manera, se obtiene un perfil de bandas que se corresponde con el número de copias de la IS6110 en el genoma de la micobacteria analizada (fig. 11). Una cepa de *M. tuberculosis* puede llegar a tener hasta 25 copias de la IS6110, lo que unido a la variabilidad posicional que presenta esta secuencia dentro del genoma, hace posible que con el método RFLP-IS6110 se puedan detectar miles de patrones de bandas diferentes (Schürch y van Soolingen, 2012).

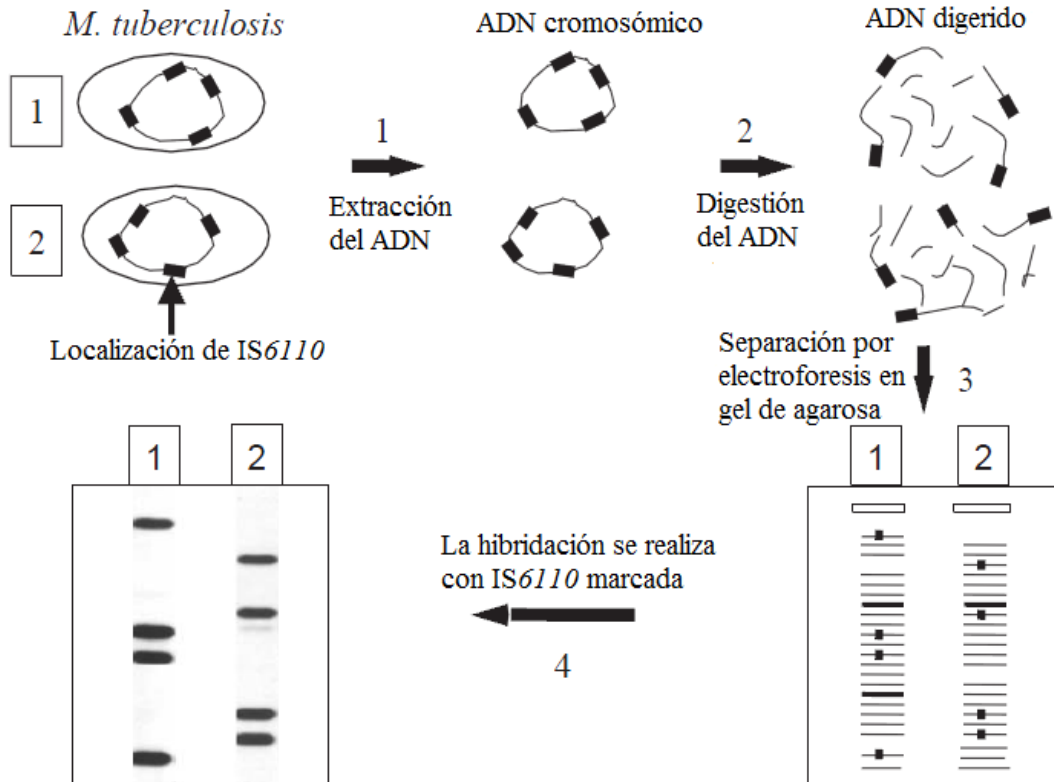


Figura 11: Representación gráfica del método RFLP-IS6110 utilizado para la caracterización genotípica de dos cepas (1 y 2) de *M. tuberculosis*. Los pequeños rectángulos negros representan la ubicación y el número de copias de la secuencia de inserción IS6110 en cada una de las cepas. Fuente: (Daley, 2005).

A pesar de su uso generalizado, el RFLP tiene la desventaja de ser un método laborioso y lento, en el que se necesita una gran cantidad de ADN de buena calidad (dos μg) para llevar a cabo la digestión enzimática; lo cual implica la realización de subcultivos de la cepa que se va a tipificar, prolongándose hasta varias semanas. Además, es necesario contar con un *software* sofisticado, y costoso, para analizar y comparar los resultados. Otra de sus limitaciones es la incapacidad para discriminar entre cepas con bajo número de copias (seis o menos) de la IS6110 (Jagielski *et al.*, 2014), como ocurre con la mayor parte de las cepas de *M. bovis* aisladas en ganado o de *M. tuberculosis* aisladas en Asia (Bauer *et al.*, 1999; Rhee *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000; Barlow *et al.*, 2001; Mathuria *et al.*, 2008; Thong-On *et al.*, 2010).

En la técnica RFLP también se han utilizado otras sondas, como la dirigida a la detección de la *IS1081*, un elemento de repetición con menor grado de polimorfismo que la *IS6110* (van Soolingen *et al.*, 1992; van Soolingen *et al.*, 1993), pero que permite distinguir a *M. bovis* BCG y *M. canettii* del resto de miembros del MTBC (Schürch y van Soolingen, 2012); o la PGRS, una secuencia especialmente útil para distinguir entre cepas con pocas copias de la *IS6110* (Poulet y Cole, 1995). En el RFLP-PGRS, la digestión del ADN se realiza con la endonucleasa de restricción *AluI*. Por su parte, el *locus* de repetición directa (*locus* DR), una región específica del MTBC, también se ha usado como diana de una sonda en esta técnica. La sonda DR, al igual que la PGRS, ha demostrado ser útil para caracterizar cepas con pocas copias de la *IS6110* (van Soolingen *et al.*, 1993).

Aunque la aplicación del RFLP revolucionó los estudios sobre la transmisión de *M. tuberculosis*, sus limitaciones metodológicas y prácticas han hecho que deje de ser considerada como la técnica de referencia. Pese a ello, el RFLP-*IS6110* sigue siendo uno de los métodos más utilizados para la tipificación de *M. tuberculosis* (Jagielski *et al.*, 2014).

8.2. Identificación de la IS6110 mediante reacción en cadena de la polimerasa

La IS6110 es una secuencia diana que se utiliza actualmente en muchas técnicas para la caracterización molecular de *M. tuberculosis*. Entre los métodos basados en la PCR se pueden destacar: PCR con mezcla de adaptadores (*mixed-linker PCR*, ML-PCR) (Haas *et al.*, 1993); unión mediada por PCR (*ligation-mediated PCR*, LM-PCR) (Prod'Hom *et al.*, 1997); unión rápida mediada por PCR (*fast ligation-mediated PCR*, FLiP) (Reisig *et al.*, 2005) y una reciente técnica de unión mediada por PCR que es conocida por su acrónimo en inglés «FLAP» ((Zaczek *et al.*, 2014a) *fast ligation amplification polymorphism*) {{930 Zaczek,A. 2014}}. Todos estos métodos siguen un protocolo similar que consta de cuatro pasos: i) digestión del ADN cromosómico utilizando enzimas de restricción que generan extremos salientes; ii) unión de los conectores o adaptadores (*linker*) a los extremos de los fragmentos de restricción generados; iii) amplificación de los productos resultantes de la unión con un cebador específico para la IS6110 y un segundo cebador complementario al conector; y iv) análisis de los productos amplificados (Jagielski *et al.*, 2014).

Las técnicas de caracterización molecular basadas en la PCR-IS6110, son muy fiables, sensibles y específicas. Además, requieren cantidades relativamente pequeñas de ADN y proporcionan una buena discriminación, aunque ligeramente inferior a la obtenida con el RFLP-IS6110 (Otal *et al.*, 1997; Kremer *et al.*, 2005a; Reisig *et al.*, 2005; Zaczek *et al.*, 2014b). La simplicidad y reproducibilidad de estos métodos los convierten en una valiosa herramienta molecular, especialmente cuando se necesita el análisis rápido de un número limitado de cepas de *M. tuberculosis* (Zaczek *et al.*, 2014a). Como era de esperar, el principal inconveniente de estas técnicas es la falta de poder discriminatorio para la tipificación de los aislados con pocas copias de la IS6110 (Ross y Dwyer, 1993; Yuen *et al.*, 1995; Wilson *et al.*, 1998).

8.3. Espoligotipado

El primer método basado en la PCR ampliamente aceptado y adoptado de manera universal para la caracterización molecular del MTBC fue el espoligotipado. Esta técnica consiste en la detección de la diversidad genética del *locus* DR (Groenen *et al.*, 1993; Kamerbeek *et al.*, 1997), una región del genoma única y altamente polimórfica que inicialmente fue identificada en la cepa de *M. bovis* BCG P3 (Hermans *et al.*, 1991). Esta región es específica del MTBC y no está presente en otras micobacterias. El *locus* DR pertenece a una familia universal de secuencias repetitivas, denominadas «CRISPR»²⁵ (Jansen *et al.*, 2002), cuya función biológica no está clara (Mojica *et al.*, 2005; Pourcel *et al.*, 2005). El *locus* DR tiene una estructura poco común, compuesta por múltiples secuencias repetitivas de 36 pb (DR), separadas por otras secuencias únicas, llamadas «espaciadores», de un tamaño que varía entre 34 y 41 pb. La secuencia DR y su espaciador adyacente forman una repetición directa variable (*direct variant repeat*, DVR). La presencia o ausencia de estas DVR permite la diferenciación entre los aislados clínicos del MTBC.

Esta técnica se realiza siguiendo un protocolo estandarizado (Kamerbeek *et al.*, 1997), que comienza con la amplificación por PCR de todo el *locus* DR. Para ello se emplean dos oligonucleótidos complementarios a las secuencias DR; uno de los cuales está marcado con biotina, por lo que todas las cadenas sintetizadas a partir de ese oligonucleótido estarán también marcadas. El siguiente paso consiste en la hibridación de los productos de la PCR a una membrana a la que están unidos covalentemente 43 oligonucleótidos. 37 de ellos se corresponden con espaciadores identificados en *M. tuberculosis* H37Rv (espaciadores 1-19, 22-32 y 37-43) y seis con espaciadores de *M. bovis* BCG (espaciadores 20, 21 y 33-36). Las señales de hibridación se detectan por

²⁵ Siglas en inglés de *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas).

quimioluminiscencia en una película para autorradiografía, a través de la unión entre un conjugado de estreptavidina-peroxidasa y los productos amplificados marcados con biotina. La visualización de un punto se corresponde con un espaciador hibridado, de tal manera que, al final, se obtiene un perfil de espilogotipo, caracterizado por la presencia o ausencia de cada uno de los 43 espaciadores evaluados.

El perfil de espilogotipo resultante se expresa mediante un código binario (donde el número «1» o la letra «n» representan la presencia del espaciador y el número «0» o la letra «o» su ausencia) que puede ser transformado en un código octal de 15 dígitos o en un código hexadecimal (Dale *et al.*, 2001). Esto hace que los resultados del espilogotipado sean fácilmente interpretables y se puedan comparar entre diferentes laboratorios. Además, ha posibilitado la creación de bases de datos internacionales, como las desarrolladas por el *Institut Pasteur de la Guadeloupe*. En 2006 se publicó «SpolDB4» (Brudey *et al.*, 2006) y seis años más tarde «SITVITWEB» (Demay *et al.*, 2012), que es una actualización de la anterior a la que se puede acceder públicamente en: http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/. SITVITWEB, además de incluir información referente al espilogotipado, también contiene datos del análisis de otros marcadores moleculares (VNTR). En ella hay registrados 7105 perfiles de espilogotipo²⁶ correspondientes a 58180 aislados clínicos del MTBC. La última actualización de la base de datos del *Institut Pasteur de la Guadeloupe* se denomina «SITVIT2» (Rastogi y Couvin, 2014), aunque a fecha de abril de 2015 todavía no está disponible públicamente. De igual forma, en el año 2003 se creó una base de datos internacional con espilogotipos de *M. bovis* que está disponible en la página web: www.mbovis.org (Smith y Upton, 2012). En España contamos también con una base de

²⁶ A cada perfil de espilogotipo (o simplemente: «espilogotipo») compartido por dos o más aislamientos se le asigna un número «SIT» (del inglés *spoligo-international type* o *shared international type*), mientras que los perfiles «ORPHAN» son aquellos que se han identificado en un solo aislado clínico. En la base de datos de *M. bovis* los espilogotipos se designan con un número «SB» (*spoligotype bovis*).

datos, denominada «mycoDB» (Rodríguez-Campos *et al.*, 2012), que recoge los registros nacionales de micobacteriosis animal desde 1996. A diferencia de la anterior, solo está disponible para los servicios veterinarios y laboratorios que participan en el «Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina».

El espoligotipado es un método simple, rápido y económico, del que se obtienen resultados reproducibles y relativamente fiables. La fiabilidad de los resultados está vinculada a la alta estabilidad del *locus* DR. Se cree que la tasa de cambio (reloj molecular) de este marcador genético es muy baja. Un estudio con aislados clínicos de pacientes con TB recurrente demostró que, aun habiendo transcurrido varios años entre un aislamiento y otro, diversas cepas de *M. tuberculosis* mostraban espoligotipos idénticos a los del primer episodio de enfermedad (Niemann *et al.*, 1999). Las ventajas enunciadas han hecho que esta técnica sea empleada tanto para conocer la diversidad de las cepas del MTBC, en estudios epidemiológicos, como para distinguir los taxones dentro del grupo (van Embden *et al.*, 2000). De este modo, se ha observado que los espoligotipos de las cepas de *M. tuberculosis* del linaje Euro-americano se caracterizan por la ausencia de los espaciadores 33-36, mientras que la mayoría de las cepas de la familia Beijing solo presentan los últimos nueve espaciadores, del 35 al 43. Por su parte, la mayor parte de las cepas de *M. bovis* y todas las de *M. bovis* BCG carecen de los espaciadores 3, 9, 16 y 39-43 (van Soolingen, 2001). Es probable que la falta de espaciadores sea el resultado de deleciones mediadas por diferentes mecanismos genéticos, como la recombinación homóloga o la transposición de la IS6110²⁷ (Groenen *et al.*, 1993; Fang *et al.*, 1998; van Embden *et al.*, 2000; Legrand *et al.*, 2001); así por ejemplo, la ausencia de los 34 primeros espaciadores en las cepas Beijing parece tener su origen en la pérdida de la RD207 (Tsolaki *et al.*, 2005).

²⁷ El *locus* DR es un punto selectivo para la integración de la IS6110.

Sin embargo, este método también tiene algunas limitaciones. Recientemente, un equipo de la Universidad de Pisa (Italia) ha evidenciado la existencia de evolución convergente en el *locus* DR (Rindi *et al.*, 2012); es decir, deleciones independientes de los mismos espaciadores en cepas que pertenecen a linajes evolutivos diferentes y que conduce a la aparición de perfiles de espoligotipo idénticos en cepas filogenéticamente no relacionadas (Comas *et al.*, 2009). La evidencia de homoplasia en el *locus* DR ya había sido descrita en otros trabajos (Warren *et al.*, 2002; Flores *et al.*, 2007; de Jong *et al.*, 2009); incluido un estudio en el que se observó que tres (de un total de 107) aislados de *M. tuberculosis* tenían perfiles de espoligotipo idénticos a los de la familia Beijing, aunque en lugar de pertenecer al linaje Asia oriental, se clasificaron como integrantes del linaje India-África oriental, razón por la cual se denominó a estas cepas como «Pseudo-Beijing» (Fenner *et al.*, 2011). En cambio, algunos autores consideran que los eventos de convergencia genética son raros en los mismos espoligotipos (Sola *et al.*, 2001a; Kato-Maeda *et al.*, 2011); por lo que el efecto y la importancia de la homoplasia en el espoligotipado, sobre todo para los estudios epidemiológicos, siguen siendo discutibles (Reyes *et al.*, 2012). Por otro lado, también se ha demostrado que el poder de discriminación del espoligotipado es inferior al del RFLP-IS6110 (Goguet de la Salmonière *et al.*, 1997; Diaz *et al.*, 1998; Kremer *et al.*, 1999; Farnia *et al.*, 2004; Gori *et al.*, 2005). La razón de su limitada capacidad discriminatoria radica en que este método se basa en la detección de un marcador genético localizado en una única región, el *locus* DR, que representa menos del 0.1 % del genoma de los miembros del MTBC. A pesar de esto, es una buena alternativa para la diferenciación de cepas de *M. tuberculosis* con pocas copias de la IS6110 (Bauer *et al.*, 1999; Cronin *et al.*, 2001); siendo una buena opción también para estudios moleculares con aislados de *M. bovis* (Roring *et al.*, 1998; Costello *et al.*, 1999).

Para suplir esa falta de discriminación se han buscado nuevos espaciadores con los que poder diseñar membranas de segunda generación (van Embden *et al.*, 2000; Caimi *et al.*, 2001). La introducción de 51 secuencias espaciadoras nuevas, 26 de ellas presentes solo en la región DR del genoma de «*M. canetti*», mejoró ligeramente el poder de discriminación del método (van Embden *et al.*, 2000). A la misma conclusión se llegó tras utilizar una membrana con 104 espaciadores (van der Zanden *et al.*, 2002). El empleo de una membrana con 68 espaciadores (no incluye los 26 espaciadores de «*M. canetti*») demostró una mejor discriminación de las cepas de *M. africanum* (Brudey *et al.*, 2004) y del linaje India-África oriental de *M. tuberculosis* (Zhang *et al.*, 2010). Asimismo, se ha probado que estas membranas de segunda generación pueden ser también útiles para los estudios epidemiológicos con aislados de *M. bovis* y *M. caprae* (Javed *et al.*, 2007).

Aparte de las ya indicadas, se han propuesto otras alternativas para intentar mejorar la funcionalidad de este método. Una de ellas emplea la tecnología desarrollada por la empresa Luminex (Austin, Texas). Este sistema, que puede detectar rápidamente múltiples secuencias de ADN, utiliza microesferas (bolas) en lugar de membranas. Las sondas de oligonucleótidos correspondientes a los 43 espaciadores se encuentran unidas covalentemente a esas microesferas, que contienen dos fluorocromos. La detección se consigue a través de la hibridación del producto amplificado a uno de esos fluorocromos. Las dos principales ventajas que ofrece la utilización de este sistema son la rapidez y el aumento de la reproducibilidad. Este método permite el análisis simultáneo de 96 muestras, más del doble de las que se analizan con la técnica original. Cuando se utilizan membranas, la reproducibilidad puede verse afectada por la determinación subjetiva de la señal de hibridación; interpretación que se vuelve más difícil con el uso repetido de la membrana. Los errores también pueden ocurrir en el

momento de transcribir de forma manual un resultado de 43 dígitos. Con el sistema Luminex se evitan estos problemas y se ha demostrado que los espigotipos generados con esta tecnología son idénticos a los obtenidos por el método original (Cowan *et al.*, 2004). Una alternativa más reciente es un ensayo en el que se utiliza la espectrometría de masas (*matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*, MALDI-TOF MS). Con este procedimiento simplificado se mejora aún más la reproducibilidad, la rapidez y el análisis de los datos (Honisch *et al.*, 2010). También se han realizado ensayos en los que se usan *biochips* (Bespyatykh *et al.*, 2014). Una limitación importante de estos sistemas innovadores y tecnológicamente más desarrollados es que se requieren equipos avanzados y costosos, que muchos laboratorios, especialmente en países con recursos limitados, no se pueden permitir (Jagielski *et al.*, 2014).

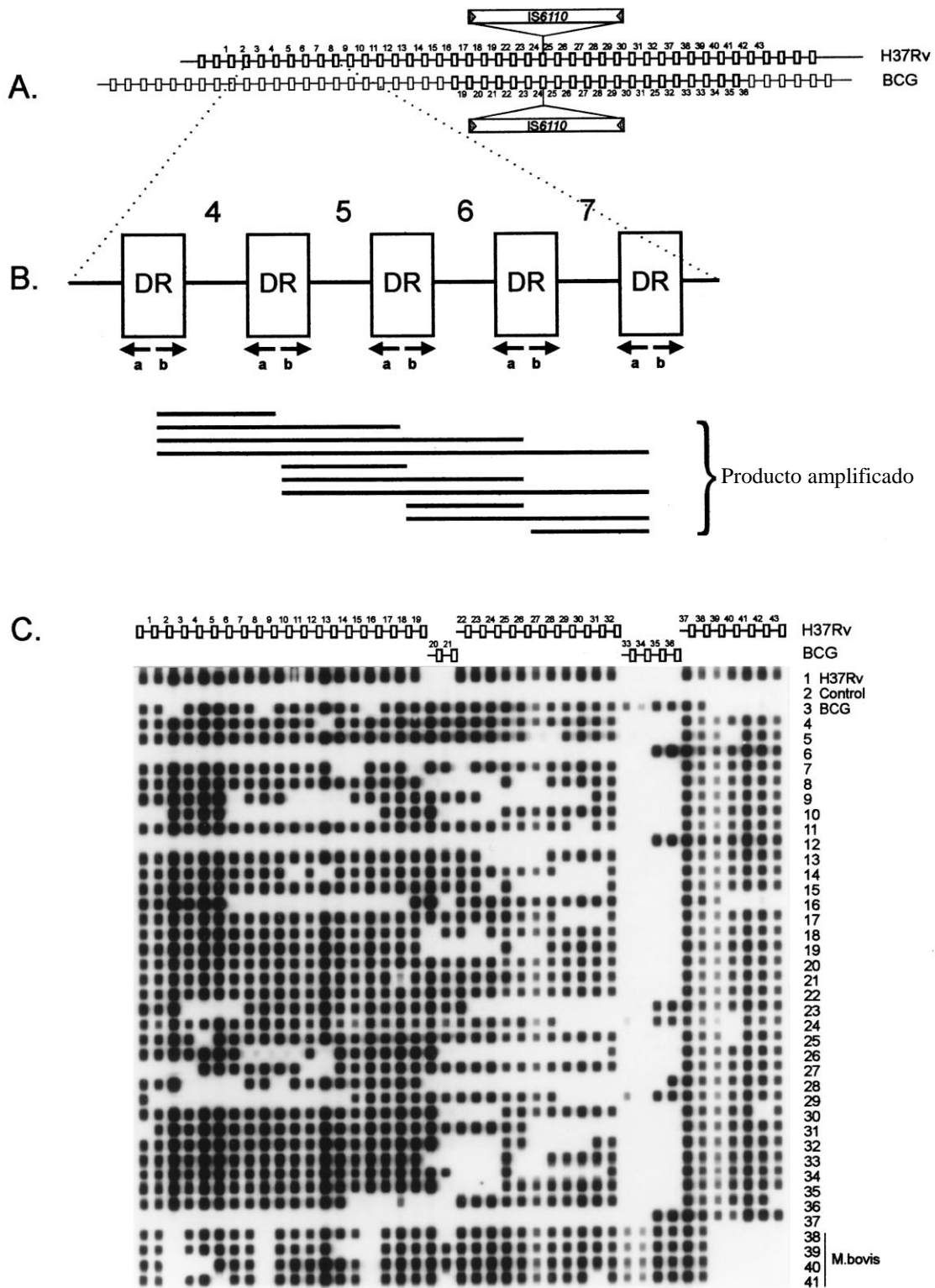


Figura 12: Representación gráfica que ilustra el fundamento para la determinación del genotipo del MTBC mediante el espoligotipado. (A) Estructura del locus DR en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG P3. Los rectángulos representan las secuencias DR. Los genomas de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG contienen 48 y 41 secuencias DR, respectivamente, que están separadas por los espaciadores (numerados del 1 al 43). (B) Principio de la amplificación por PCR de la región DR. (C) Patrones de hibridación (espoligotipos). El orden de los espaciadores en la película se corresponde con su orden dentro del genoma. Fuente: Kamerbeek *et al.* (1997).

8.4. Análisis del número variable de repeticiones en tándem de múltiples *loci*

El MLVA es otro de los métodos basados en la PCR que permite detectar el polimorfismo genético existente entre los aislados del MTBC. En este caso, dicho polimorfismo se origina por adición o pérdida de secuencias repetidas en un *locus* específico. *M. tuberculosis* fue una de las primeras especies bacterianas en la que se identificaron regiones, semejantes a los *loci* minisatélites descritos en los genomas eucariotas, con secuencias que se repiten de forma consecutiva. A estas regiones se las llamó, por analogía con las identificadas previamente en los seres humanos y los animales, *loci* VNTR (Jagielski *et al.*, 2014). El MLVA es, por lo tanto, un método de caracterización molecular que está basado en la determinación del número de secuencias repetidas en tándem en diferentes *loci* VNTR, los cuales se encuentran repartidos por todo el genoma bacteriano (fig. 13).

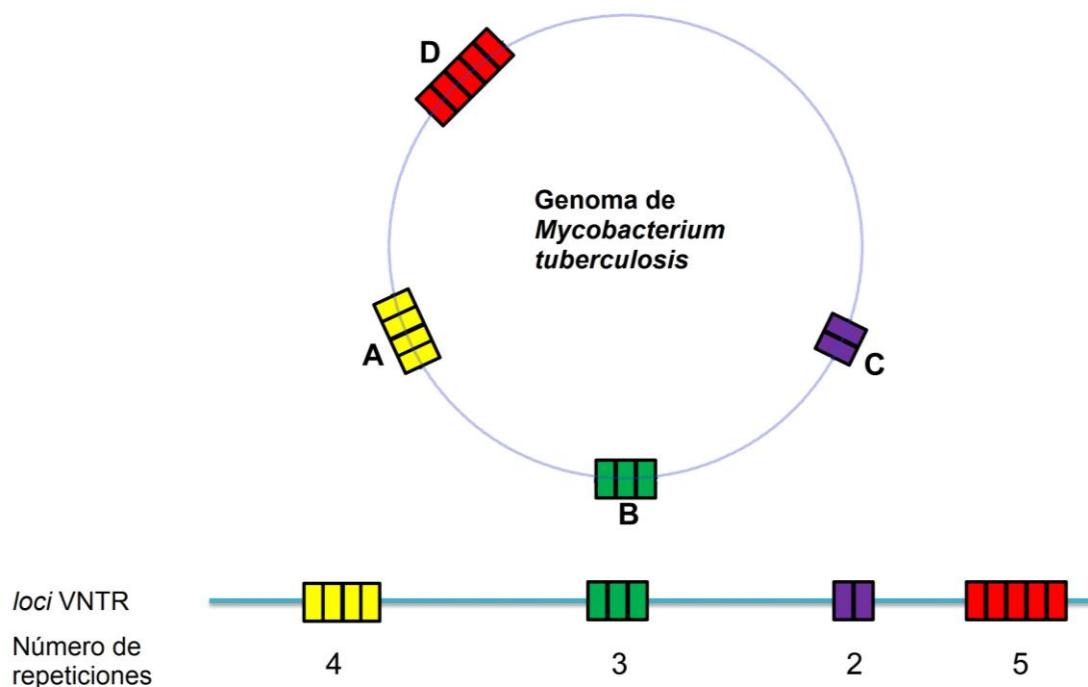


Figura 13: Esquema que ilustra el principio sobre el que se apoya el MLVA. Este método se basa en la identificación de un número diferente de repeticiones en múltiples *loci* VNTR dispersos por todo el genoma bacteriano (marcados con A, B, C y D en la figura). El número de repeticiones se calcula midiendo el tamaño del fragmento producido mediante la amplificación de todo el *locus* con cebadores específicos para las secuencias que lo flanquean. Con la combinación del número de secuencias repetidas en cada *locus* VNTR se genera un código numérico único (4325), que se almacena fácilmente en bases de datos internacionales y se puede utilizar para establecer vínculos filogenéticos y epidemiológicos entre cepas. Adaptado de Comas *et al.* (2009).

En los primeros *loci* VNTR estudiados (Frothingham y Meeker-O'Connell, 1998) se identificaron las denominadas secuencias de repetición en tándem con polimorfismos mayoritarios (*major polymorphic tandem repeat*, MPTR) y las secuencias exactas repetidas en tándem (*exact tandem repeat*, ETR), que se encontraron en cinco (MPTR A-E) y seis (ETR A-F) *loci* respectivamente. Los *loci* MPTR están compuestos por secuencias idénticas de 10 pb separadas por secuencias espaciadoras variables de 5 pb. Estos elementos repetitivos han sido identificados en el MTBC, así como en otras micobacterias, incluyendo *M. goodii*, *M. kansasii* o *M. szulgai* (Hermans *et al.*, 1992). Por el contrario, los *loci* ETR se han encontrado exclusivamente en las cepas del MTBC, y contienen repeticiones cuyo tamaño varía entre 53 y 79 pb. La secuenciación de los *loci* ETR reveló que todos eran variables. En cambio, entre los *loci* MPTR solo uno (MPTR-A) mostró variabilidad (Frothingham y Meeker-O'Connell, 1998). De los 11 *loci* MPTR/ETR, se comprobó que tan solo cinco (ETR A-E) tenían el suficiente poder discriminatorio como para usarlos de forma rutinaria en la caracterización molecular de cepas del MTBC (Kremer *et al.*, 1999). A pesar de ser un método rápido, fácil de realizar y altamente reproducible, el análisis basado en estos cinco *loci* ETR tiene un poder de discriminación bajo, en comparación con el RFLP-IS6110 o el espigotipado (Kremer *et al.*, 1999; Filliol *et al.*, 2000; Barlow *et al.*, 2001; Roring *et al.*, 2002).

Tras la secuenciación completa del genoma de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* se identificaron nuevos *loci* VNTR. Entre ellos, unos que contenían un tipo de secuencias repetitivas específicas de las micobacterias llamadas unidades de repetición intercaladas (*mycobacterial interspersed repetitive units*, MIRU) (Supply *et al.*, 1997). Las MIRU son secuencias de ADN, de un tamaño entre 46 y 100 pb, que están dispersas por todo el genoma de las micobacterias, generalmente dentro de las regiones

intergénicas. En concreto, el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv contiene 41 *loci* MIRU (Supply *et al.*, 2000). 12 de ellos se seleccionaron para la caracterización molecular de aislados de *M. tuberculosis* (Supply *et al.*, 2000; Mazars *et al.*, 2001). El análisis MIRU-VNTR²⁸, como cualquier ensayo basado en el polimorfismo de los *loci* VNTR, conlleva la amplificación por PCR de varios de esos marcadores moleculares. Cada *locus* es amplificado con cebadores específicos, usando dos oligonucleótidos complementarios a las regiones que flanquean dicho *locus*. Los productos resultantes de la PCR se visualizan mediante electroforesis, ya sea en geles de agarosa o utilizando un secuenciador automatizado (electroforesis capilar); en este último caso, uno de los oligonucleótidos de cada par se marca con sondas fluorescentes. El número de repeticiones se calcula midiendo el tamaño del fragmento producido mediante la amplificación de todo el *locus* VNTR; como el tamaño de la secuencia que se repite en cada *locus* es conocido, el tamaño del amplicón refleja el número de copias amplificadas de la secuencia en cuestión (Frothingham y Meeker-O'Connell, 1998; Supply *et al.*, 2000). Los resultados se expresan en un código numérico de varios dígitos, en el que cada cifra representa el número de repeticiones existentes en cada uno de los *loci* VNTR analizados (Supply *et al.*, 2001; Supply *et al.*, 2006). Este sistema permite que los resultados puedan ser comparados entre laboratorios y facilita que los datos sean recogidos en bases de datos internacionales; información que puede ser utilizada en estudios genéticos y epidemiológicos a gran escala (Hill *et al.*, 2012). La ya mencionada SITVITWEB (Demay *et al.*, 2012), contiene datos tanto del espoligotipado como del análisis basado en los 12 *loci* MIRU (*MIRU international type*, MIT) y en los

²⁸ Habitualmente se tiende a emplear la sigla en inglés «VNTR» para referirse al método de caracterización molecular basado en la determinación del número variable de repeticiones en tándem de varios *loci*; posiblemente derivada de la expresión en inglés *VNTR-typing*. De igual forma, es frecuente utilizar «MIRU-VNTR» para nombrar a este método cuando se aplica al estudio de micobacterias, aunque los *loci* VNTR amplificados no formen parte de los originalmente nombrados por Supply *et al.* (1997) con el acrónimo «MIRU». Por ello, creemos que para referirnos a este método, lo más acertado es usar: «Análisis del número variable de repeticiones en tándem de múltiples *loci*», que sería la traducción de *Multiple-locus VNTR analysis* [de forma abreviada: MLVA] (Lindstedt, 2005).

cinco *loci* ETR (*VNTR international type*, VIT). En total, esta base de datos incluye 62582 aislados clínicos del MTBC procedentes de 153 países (105 países de aislamiento). Por su parte, la aplicación web de libre acceso (www.miru-vnrplus.org/) denominada «MIRU-VNTRplus» (Allix-Béguec *et al.*, 2008b; Weniger *et al.*, 2010), contiene datos obtenidos a partir de métodos basados en cinco marcadores diferentes (RFLP-IS6110, CRISPR, VNTR, LSP y SNP) y permite el análisis combinado de los mismos.

En general, el análisis basado en secuencias minisatélites es un procedimiento rápido, sensible, específico y altamente reproducible. Además, la heterogeneidad observada en los *loci* VNTR (que todavía se están descubriendo en el genoma de los bacilos de la TB) proporciona una gran flexibilidad en el diseño de nuevas combinaciones de marcadores que permiten mejorar la capacidad de discriminación de este método. Poder de discriminación que, por otra parte, suele aumentar cuando el número de *loci* VNTR evaluados es mayor. Así, el análisis de 12 *loci* MIRU-VNTR es un método cuya capacidad de discriminación es superior al análisis basado en los cinco *loci* ETR, y se aproxima o incluso supera a la del análisis del RFLP-IS6110. No obstante, cuando se compara con el RFLP-IS6110, el poder de discriminación varía en función de las copias de la IS6110 presentes en los aislados investigados. De esta forma, se ha observado que cuando se analizan aislados de *M. tuberculosis* con un número de copias bajo, el genotipado con MIRU-VNTR es ligeramente más discriminatorio que cuando se utiliza el RFLP-IS6110 (Mazars *et al.*, 2001; Supply *et al.*, 2001; Hawkey *et al.*, 2003; Blackwood *et al.*, 2004). En cambio, el poder de discriminación es menor si el número de copias de la IS6110 en los aislados investigados es alto (Cowan *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). Por ello, es aconsejable no utilizar el análisis de 12 *loci* MIRU-VNTR como único método de tipificación, ya que tiende a sobreestimar el número de vínculos

epidemiológicos reales, especialmente en grandes estudios poblacionales (Cowan *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2005). De ahí que se haya recomendado usar esta combinación de marcadores junto con otros métodos de caracterización molecular, como el RFLP-IS6110 (Blackwood *et al.*, 2004) o el espigotipado (Cowan *et al.*, 2005).

Alternativamente, y con el objetivo de optimizar y estandarizar esta técnica, en el año 2006 se propuso un nuevo conjunto de 24 *loci* VNTR para el genotipado de *M. tuberculosis* (Supply *et al.*, 2006). Dentro de este conjunto, que contiene los 12 *loci* MIRU-VNTR originales descritos previamente, se definió un subgrupo altamente discriminatorio de 15 *loci* VNTR, que agrupó al 96 % de todos los polimorfismos detectados por el conjunto completo. Varios estudios han demostrado que el poder discriminatorio de este nuevo sistema basado en 24 o 15 *loci* VNTR es igual al del RFLP-IS6110 (Oelemann *et al.*, 2007; Allix-Béguec *et al.*, 2008b; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2008; de Beer *et al.*, 2013). Esto, unido a su rapidez, la necesidad de pequeñas cantidades de ADN y la simplicidad para comparar resultados que pueden ser digitalizados, ha favorecido que se considere a este método como la nueva técnica de referencia (*gold standard*) para la realización de estudios de epidemiología molecular con aislados del MTBC. En concreto, se ha propuesto que el análisis basado en 15 *loci* sea el método de referencia para la caracterización molecular de los aislados de *M. tuberculosis* en los estudios epidemiológicos, mientras que se recomienda utilizar el set de 24 *loci* para determinar la diversidad genética de las cepas en estudios filogenéticos (Supply *et al.*, 2006). En el año 2009 se investigó por primera vez la idoneidad de este grupo de 24 *loci* VNTR para la caracterización genotípica de aislados del MTBC mediante el MLVA, en un estudio en el que participaron 37 laboratorios de todo el mundo (de Beer *et al.*, 2012). Los resultados revelaron una reproducibilidad entre los laboratorios de tan solo el 60 %, mientras que la reproducibilidad dentro de los

laboratorios fue del 72 %. Después de identificar problemas importantes en el uso de la técnica, se determinó que era necesario introducir algunas mejoras metodológicas, así como un mayor grado de estandarización. Para medir los efectos logrados tras esa última optimización se ha llevado a cabo un segundo estudio, en 41 laboratorios de 36 países diferentes, en el que se han observado avances importantes, con el aumento de la reproducibilidad entre los laboratorios al 78 % y dentro de los laboratorios al 88 % (de Beer *et al.*, 2014).

Gracias a estos estudios, que incluyen fundamentalmente aislados de *M. tuberculosis*, el MLVA es una técnica estandarizada. Sin embargo, para las investigaciones con aislados de *M. bovis* aún no existe un conjunto normalizado de *loci* VNTR que asegure una buena discriminación en cualquier parte del mundo. Hasta el momento solo se han encontrado diferentes combinaciones de *loci* VNTR validadas únicamente en determinados países (Boniotti *et al.*, 2009; Duarte *et al.*, 2010; McLernon *et al.*, 2010). En nuestro país, se ha usado un conjunto de nueve²⁹ *loci* VNTR en una investigación en la que se analizó una colección de aislados de *M. bovis* españoles con el espoligotipo SB0121, el más prevalente en la península ibérica (Duarte *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2010), y se observó que dicha combinación tenía un poder de discriminación razonablemente alto (Rodríguez-Campos *et al.*, 2013). Estos datos han sido corroborados en un estudio posterior basado en tres PCR múltiples en el que los productos se analizaron mediante electroforesis capilar y la asignación alélica se realizó de forma automática (Navarro *et al.*, 2014).

²⁹ Seis de estos marcadores (VNTR2165, VNTR2461, VNTR580, VNTR2163a, VNTR2163b y VNTR3232) habían sido recomendados por la red de investigación internacional «VENoMYC» (*Veterinary Network of Laboratories Researching into Improved Diagnosis and Epidemiology of Mycobacterial Diseases*) (Supply, 2006) y los tres restantes [VNTR3192 y VNTR2996 (Gortázar *et al.*, 2005) y VNTR4052 (Romero *et al.*, 2008)] se han usado con éxito en el genotipado de cepas españolas.

Nombre del locus VNTR	Alias MIRU	Alias ETR	Alias QUB*	Otro alias	Referencia
154	MIRU 2				(Supply <i>et al.</i> , 2000)
424				Mtub04	(Le Flèche <i>et al.</i> , 2002)
531				MPTR-A	(Frothingham y Meeker-O'Connell, 1998)
577		ETR-C			(Frothingham y Meeker-O'Connell, 1998)
580	MIRU 4	ETR-D			(Frothingham y Meeker-O'Connell, 1998)
802	MIRU40				(Supply <i>et al.</i> , 2000)
960	MIRU 10				(Supply <i>et al.</i> , 2000)
1644	MIRU 16				(Supply <i>et al.</i> , 2000)
1955				Mtub21	(Le Flèche <i>et al.</i> , 2002)
2059	MIRU 20				(Supply <i>et al.</i> , 2000)
2163a			QUB-11a		(Skuce <i>et al.</i> , 2002)
2163b			QUB-11b		(Skuce <i>et al.</i> , 2002)
2165		ETR-A			(Goyal <i>et al.</i> , 1994)
2347				Mtub29	(Le Flèche <i>et al.</i> , 2002)
2401				Mtub30	(Le Flèche <i>et al.</i> , 2002)
2461		ETR-B			(Frothingham y Meeker-O'Connell, 1998)
2531	MIRU 23				(Supply <i>et al.</i> , 2000)
2387	MIRU 24				(Supply <i>et al.</i> , 2000)
2996	MIRU 26				(Supply <i>et al.</i> , 2000)
3006	MIRU 27		QUB-5		(Supply <i>et al.</i> , 2000)
3171				Mtub34	(Le Flèche <i>et al.</i> , 2002)
3192	MIRU 31	ETR-E			(Frothingham y Meeker-O'Connell, 1998)
3232			QUB-3232		(Roring <i>et al.</i> , 2002)
3239		ETR-F			(Frothingham y Meeker-O'Connell, 1998)
3336			QUB-3336		(Roring <i>et al.</i> , 2002)
3690				Mtub39	(Le Flèche <i>et al.</i> , 2002)
4052			QUB-26		(Skuce <i>et al.</i> , 2002)
4156			QUB-4156		(Roring <i>et al.</i> , 2002)
4348	MIRU39				(Supply <i>et al.</i> , 2000)

Tabla 4: Principales loci VNTR utilizados en los estudios de caracterización genotípica de los aislados del MTBC mediante el MLVA. Los coloreados en gris oscuro se corresponden con el subgrupo altamente discriminatorio de 15 loci VNTR que forman parte del conjunto de 24 loci propuesto por Supply *et al.* (2006) para la estandarización de la técnica; los nueve restantes están resaltados en color gris claro.

* QUB (Queen's University Belfast).

8.5. Electroforesis en campo pulsante

La tipificación mediante electroforesis en campo pulsante (*pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE) se basa en el análisis de todo el ADN cromosómico después de ser sometido a una digestión con enzimas de restricción y a un campo eléctrico que cambia periódicamente su orientación. En general, esta técnica implica la extracción del ADN de la bacteria de una manera suave mediante la ruptura de la pared celular tras infiltrar una suspensión del organismo en un bloque de agarosa. Seguidamente, se lleva a cabo la digestión del ADN cromosómico con endonucleasas de restricción y una electroforesis en gel de agarosa para separar los fragmentos obtenidos tras la digestión enzimática. La PFGE permite la separación de fragmentos grandes (hasta 10 Mb) de ADN, mientras que con el uso de una electroforesis convencional no se pueden separar bandas de más de 50 kb. Esto se logra mediante la variación de la duración del impulso eléctrico y el cambio de la dirección de la corriente. Después de la electroforesis, los patrones de bandas resultantes se comparan, usando un conjunto predefinido de criterios para establecer relaciones genéticas y epidemiológicas entre las cepas (Tenover *et al.*, 1995). Aunque el poder discriminatorio de este método es alto y se ha utilizado con éxito para diferenciar entre cepas de *M. tuberculosis* (Feizabadi *et al.*, 1997), *M. bovis* (Feizabadi *et al.*, 1996) y *M. bovis* BCG (Zhang *et al.*, 1995), el genotipado mediante PFGE se utiliza muy poco en investigaciones con aislados del MBTC, debido a que tiene varias limitaciones. Entre sus desventajas se puede destacar que es un proceso técnicamente exigente, que requiere personal especializado; es lento, ya que se necesitan varios días para completar todo el protocolo; y conlleva unos costes considerables. Al mismo tiempo, se precisa ADN de buena calidad y en cantidad suficiente para la digestión con enzimas de restricción (Hughes *et al.*, 2001). Además, se ha observado que el análisis de la PFGE no siempre genera la suficiente

discriminación entre cepas (Feizabadi *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 1999; Khosravi *et al.*, 2014). Por ello, aunque se ha convertido en la técnica de referencia para la tipificación de otras bacterias, principalmente de agentes patógenos transmitidos por los alimentos (Peters, 2009) como *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter* o *Escherichia coli*, (fig. 14), no es habitual utilizarlo en los laboratorios especializados en TB (Schürch y van Soolingen, 2012). No obstante, sigue siendo el método de tipificación más usado para micobacterias no tuberculosas (Jagielski *et al.*, 2014).

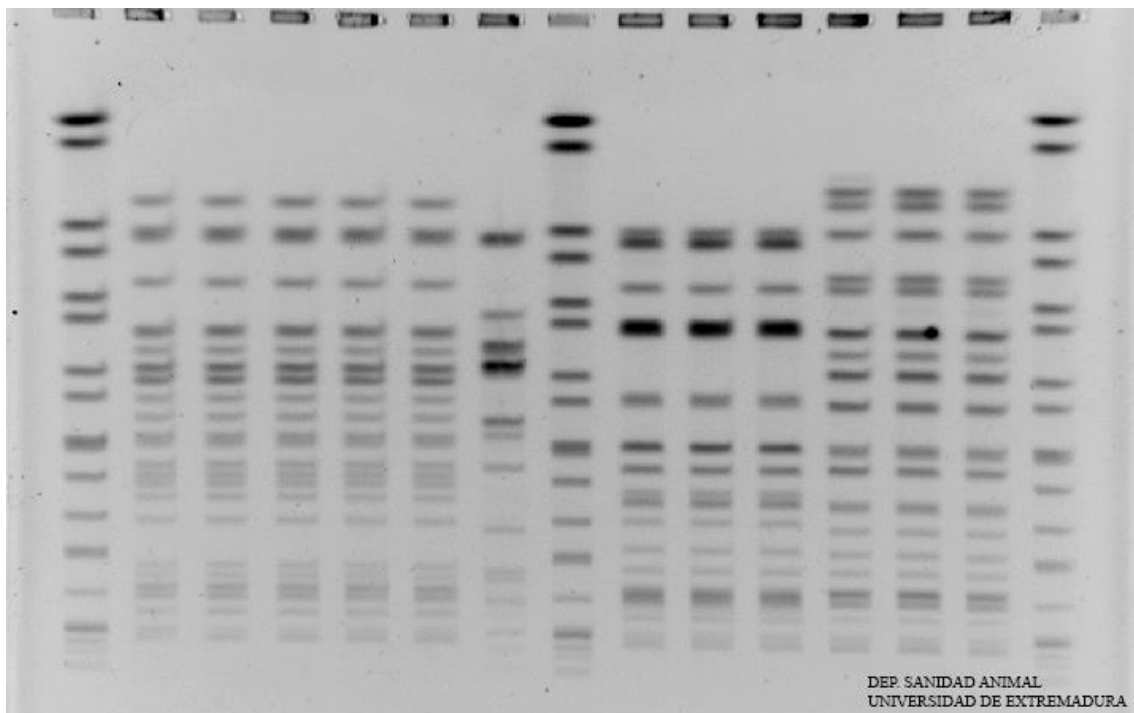


Figura 14: Imagen de un gel de agarosa utilizado para la caracterización, mediante PFGE, de cepas verotoxigénicas de *Escherichia coli* O157:H7.

8.6. Análisis de deleciones

La pérdida de material genético ha marcado la historia evolutiva del MTBC. La comparación de los genomas de diversas cepas de *M. tuberculosis* ha permitido detectar mutaciones genéticas, que consisten en la pérdida de uno o más nucleótidos de la secuencia del ADN, también conocidas como RD o LSP. Las deleciones no se distribuyen al azar, sino que más bien aparecen en agregaciones, y ocurren tanto dentro de los genes como en las regiones intergénicas (Kato-Maeda *et al.*, 2001; Brosch *et al.*, 2002; Fleischmann *et al.*, 2002; Tsolaki *et al.*, 2004). En un estudio con 100 aislados clínicos de *M. tuberculosis*, Tsolaki *et al.* (2004) encontraron 68 deleciones distintas, cuyo tamaño varió desde 105 pb hasta aproximadamente 12 kb. Este trabajo puede servir como ejemplo para evidenciar que las RD son una importante fuente de variabilidad genética entre cepas, razón por la cual han sido utilizadas como marcadores moleculares en el estudio de la filogenia y la evolución del MTBC (Brosch *et al.*, 2002; Mostowy *et al.*, 2002; Hirsh *et al.*, 2004; Tsolaki *et al.*, 2004; Tsolaki *et al.*, 2005; Gagneux *et al.*, 2006; Alland *et al.*, 2007). El análisis de deleciones, también conocido como *deligotyping*, se puede realizar mediante un procedimiento simple basado en la PCR o empleando *microarrays* (Goguet de la Salmonière *et al.*, 2004). La determinación de las RD en el laboratorio es fácil y sencilla. Sin embargo, este análisis tiene algunas limitaciones: la distancia genética entre dos grupos de cepas es imposible de determinar si solo se tiene en cuenta la presencia o ausencia de las RD, y su poder de discriminación es limitado para los linajes que no presentan las RD estudiadas. En definitiva, el análisis de deleciones es un método muy sensible y eficaz para la detección rápida de aislados clínicos de *M. tuberculosis*, resultando también muy apropiado para establecer relaciones filogenéticas (Goguet de la Salmonière *et al.*, 2004).

8.7. Análisis de polimorfismos de un solo nucleótido

A la hora de decidir qué marcador molecular es el más apropiado para los estudios filogenéticos con aislados del MTBC, se debe ser cauto al recurrir a *loci* que han podido evolucionar demasiado rápido, debido a la aparición de eventos evolutivos convergentes como los descritos en las CRISPR (Warren *et al.*, 2002) o en los *loci* VNTR (Hanekom *et al.*, 2008). Para definir asociaciones filogenéticas inequívocas, los marcadores moleculares tienen que ser únicos y, a ser posible, irreversibles. De los marcadores filogenéticos empleados en el estudio del MTBC, los LSP y los SNP son los que mejor cumplen con esas condiciones (Abadia *et al.*, 2010). Los SNP son los menos mutables de todos, siendo poco probable, aunque no imposible (Colangeli *et al.*, 2014), que muestren homoplasia. Además, solo el análisis de SNP permite detectar la presencia de recombinación en el MTBC (Namouchi *et al.*, 2012). Por ello, son los marcadores moleculares más apropiados para los estudios filogenéticos (Sreevatsan *et al.*, 1997; Gutacker *et al.*, 2002; Alland *et al.*, 2003; Baker *et al.*, 2004; Filliol *et al.*, 2006; Gutacker *et al.*, 2006; Dos Vultos *et al.*, 2008; Hershberg *et al.*, 2008). A pesar de que se han propuesto varias combinaciones de estos marcadores para el estudio del MTBC (Filliol *et al.*, 2006; Comas *et al.*, 2009; Abadia *et al.*, 2010; Homolka *et al.*, 2012; Stucki *et al.*, 2012; Coll *et al.*, 2014; Feuerriegel *et al.*, 2014), sigue sin definirse un conjunto normalizado de SNP que sirva como referencia. Tampoco existe una base de datos completa, actualizada, bien organizada y fácil de usar (Stucki y Gagneux, 2013).

Los SNP se dividen en dos grupos principales: *synonymous*-SNP (s-SNP) y *nonsynonymous*-SNP (ns-SNP). Estos últimos, si están presentes en las regiones de codificación, pueden introducir cambios en aminoácidos que alteran la estructura de las proteínas. Este hecho puede influir tanto en los procesos evolutivos como en el fenotipo. Así, por ejemplo, los ns-SNP a menudo se encuentran en *loci* asociados con la

resistencia a los fármacos antituberculosos (Ramaswamy y Musser, 1998; Schürch *et al.*, 2011). La detección de ns-SNP en los genes que confieren resistencia a los medicamentos ofrece importantes conocimientos sobre los mecanismos moleculares que intervienen en el desarrollo de dicha resistencia (Jagielski *et al.*, 2014).

Por el contrario, los s-SNP no alteran la estructura de las proteínas y son, por consiguiente, fenotípicamente neutrales. Como también se supone que desde el punto de vista evolutivo son selectivamente neutrales, los s-SNP pueden ser utilizados como marcadores inequívocos en estudios de genética de poblaciones y para la determinación de las relaciones filogenéticas entre las cepas de las micobacterias (Baker *et al.*, 2004; Gutacker *et al.*, 2006). Recientemente, Dos Vultos *et al.* (2008), han propuesto a los SNP localizados en los genes que codifican componentes del sistema 3R (genes que están implicados en la replicación, recombinación y reparación del ADN) como los marcadores genéticos esenciales para estudiar la evolución de *M. tuberculosis*. Aunque los SNP representan los marcadores más fiables para la clasificación del MTBC, su uso está limitado por la necesidad de tener que analizar un gran número de genes para obtener resultados aceptables (Jagielski *et al.*, 2014). Además, con este método es imposible realizar una estimación de la distancia genética entre cepas, y se derivan filogenias «lineales» (Pearson *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009), en las que las dos cepas utilizadas para identificar los SNP están posicionadas en los extremos y las demás cepas analizadas se sitúan en algún lugar a lo largo de esa línea, no existiendo ramas secundarias (*branch collapse*). En resumen, el análisis de SNP es un método altamente sensible y específico que resulta muy útil en la determinación de relaciones filogenéticas, aunque tiene un valor limitado como técnica rutinaria de genotipado.

8.8. Secuenciación completa del genoma

La WGS promete ser la herramienta definitiva para conocer más sobre los agentes patógenos y la epidemiología de las enfermedades. En el caso de *M. tuberculosis* los análisis basados en la WGS se han empezado a aplicar recientemente. En 2010 y 2011, se comunicaron los primeros resultados de trabajos en los que se llevó a cabo la WGS de aislados de *M. tuberculosis* y se hizo evidente que esta nueva estrategia molecular proporcionaba una mayor discriminación que los métodos de tipificación convencionales (Schürch *et al.*, 2010a; Gardy *et al.*, 2011). De esta forma, algunos casos que habían sido agrupados mediante el análisis del RFLP o el MLVA en estudios previos, se subdividieron en nuevos grupos. Estos resultados coincidían de un modo más preciso con la información obtenida en el seguimiento de los contactos.

Hasta el trabajo de Walker *et al.* (2014) en el condado de Oxfordshire (Reino Unido), la WGS se había utilizado en estudios retrospectivos, como los llevados a cabo para investigar brotes de *M. tuberculosis* (Gardy *et al.*, 2011; Kato-Maeda *et al.*, 2013; Roetzer *et al.*, 2013; Walker *et al.*, 2013). Sin embargo, según los autores de ese trabajo, el suyo ha sido el primer estudio en el que se aplica la WGS para cuantificar con mayor precisión la transmisión de la TB dentro de una población no seleccionada, en una localización definida y durante un período fijo (2007-2012). Esto les ha permitido evaluar la eficacia de las medidas existentes para controlar la TB y obtener datos para diseñar futuras intervenciones en materia de Salud Pública (Walker *et al.*, 2014).

Además de para aclarar estas u otras cuestiones epidemiológicas, como por ejemplo, distinguir el origen de la recurrencia en pacientes infectados con *M. tuberculosis* (Bryant *et al.*, 2013a) o detectar la transmisión reciente en un país con alta carga de TB (Luo *et al.*, 2014), la secuenciación del genoma también se puede usar para analizar aspectos evolutivos (Comas *et al.*, 2010; Schürch *et al.*, 2011) o para

determinar la tasa de mutación de *M. tuberculosis* (Ford *et al.*, 2011; Bryant *et al.*, 2013b; Walker *et al.*, 2013; Colangeli *et al.*, 2014; Guerra-Assunção *et al.*, 2015). En este sentido, en un estudio realizado en el Reino Unido se estimó una tasa de mutación de 0.5 SNP/genoma/año (Walker *et al.*, 2013), mientras que en un trabajo con pacientes de Malawi esta tasa fue de 0.26 SNP/genoma/año (Guerra-Assunção *et al.*, 2015); muy parecida a la estimada en una investigación en los Países Bajos (Bryant *et al.*, 2013b) y cercana también a la estimación hecha en un estudio en macacos (Ford *et al.*, 2011), que fueron de 0.3 y 0.39 SNP/genoma/año respectivamente. Ford *et al.* (2011) encontraron que en los macacos las tasas de mutación durante la enfermedad activa y la latencia eran similares. Estos resultados contrastan con las observaciones de Colangeli *et al.* (2014), al hallar unas tasas de cambio sustancialmente más bajas durante la latencia³⁰. En este trabajo, los autores fueron capaces de estimar la tasa de multiplicación y mutación de «bacilos latentes» de *M. tuberculosis* mediante la comparación de la secuencia del genoma de una cepa que había sido transmitida desde un solo caso índice y fue la causante de la enfermedad en contactos cercanos, que no desarrollaron TB activa hasta pasados más de 20 años. Según estos autores, la latencia implica bajas tasas de multiplicación y mutación en comparación con la enfermedad activa. Así pues, parece que la latencia humana puede diferir de la latencia en primates no humanos. Aunque según los propios autores del estudio, estos resultados deberán ser validados en otros trabajos con diferentes poblaciones de pacientes y cepas de *M. tuberculosis*, ya que ellos solo pudieron estudiar dos casos con un período largo de latencia. Por tanto, es posible que exista una mayor variedad de tasas de mutación entre los millones de seres humanos con infección latente. Especialmente si se tiene en cuenta lo expuesto en el apartado 6.1 de esta revisión bibliográfica.

³⁰ Las medias de las tasas de mutación fueron: 5.5×10^{-10} mutaciones/pb/generación para la TB transmitida recientemente y 7.3×10^{-11} mutaciones/pb/generación para la TB latente.

La WGS también se ha aplicado al estudio de aspectos relacionados con la «evolución *in vitro*» de *M. tuberculosis* (Ioerger *et al.*, 2010; Comas *et al.*, 2012) y *M. bovis* BCG (Pan *et al.*, 2011; Copin *et al.*, 2014); así como de cuestiones relativas con la «microevolución» de *M. tuberculosis* dentro de un paciente (Merker *et al.*, 2013; Pérez-Lago *et al.*, 2014a). El análisis de varios aislados de un mismo paciente ha permitido establecer que la diversidad genética dentro de un huésped puede ser tan alta como la encontrada entre pacientes. Además, la variación genética durante el curso de una infección se ha probado tanto en localizaciones extrapulmonares (no repercute en la transmisión) como en pacientes con TB pulmonar. En este último caso, esa diversidad genética puede ser finalmente transmitida (Pérez-Lago *et al.*, 2014a).

Como en el análisis del RFLP y el MLVA, la utilidad de la WGS depende de la estructura de la población de *M. tuberculosis* existente en el entorno en que se usa (Sloot *et al.*, 2013). Comprobemos por qué: en su estudio, Walker *et al.* (2014) consideraban que existía una posible transmisión cuando había como máximo 12 SNP de diferencia entre el par de aislados comparados. Tan solo en unos pocos casos, en los que se identificaron menos de 12 SNP de diferencia, se confirmó una relación epidemiológica a través de entrevistas; estos resultados coinciden con los de una investigación anterior en Ámsterdam (Bryant *et al.*, 2013b). ¿Indica esto que en esas zonas están circulando cepas con pocas o incluso sin diferencias y sin que haya ningún vínculo epidemiológico entre los casos? ¿O estamos de nuevo, y esta vez utilizando un marcador más preciso y con mayor poder de discriminación, ante un método que no es capaz de aclarar cómo se produjo la transmisión de la TB? ¿Es, sencillamente, imposible confirmar todos los casos de transmisión mediante entrevistas con los pacientes? Otra gran preocupación que no ha sido suficientemente investigada es que, según algunos indicios, los aislados de *M. tuberculosis* no son poblaciones homogéneas,

sino que integran poblaciones con diferentes perfiles de SNP (Schürch *et al.*, 2010b). Con los medios actualmente disponibles para la WGS, solo se visualiza el perfil de SNP de la población predominante, aunque ese predominio puede cambiar cuando la cepa se transmite a otra persona (van Soolingen, 2014).

Si a esto le añadimos su elevado coste y la complejidad para analizar los datos obtenidos, parece que, desafortunadamente, tampoco estamos ante el método perfecto; aunque es una alternativa al MLVA que cada vez es más accesible y asequible, y en la que se tienen depositadas muchas esperanzas en un futuro no muy lejano. Pero hasta que llegue ese momento, en la mayoría de los laboratorios, la caracterización molecular de aislados de *M. tuberculosis* requiere el análisis de al menos dos marcadores para discriminar aislamientos epidemiológicamente no relacionados (Rozo-Anaya y Ribón, 2010). Evidentemente, la misma fórmula debería ser aplicable a cualquier miembro del MTBC.

9. La epidemiología molecular como fuente del conocimiento

La epidemiología molecular es un campo que ha surgido, en gran parte, de la integración de la biología molecular, la medicina clínica, la estadística y la epidemiología (Mathema *et al.*, 2006). Con la utilización de este enfoque multidisciplinar se persigue identificar el origen de la infección, así como los factores que determinan la transmisión, la difusión y la distribución de la enfermedad en las poblaciones. El papel que ha desempeñado la epidemiología molecular en la mejora del conocimiento de la TB en las dos últimas décadas es indiscutible. A esto también ha contribuido en gran medida el diseño de aplicaciones web, disponibles públicamente, que han permitido utilizar los datos de la epidemiología molecular para abordar de una manera global e integradora los desafíos actuales que sigue planteando esta enfermedad (Shabbeer *et al.*, 2012b).

En general, la aplicación de estrategias de genotipado al estudio de la TB ha mejorado nuestra comprensión sobre la biología de *M. tuberculosis* y la patogénesis de la enfermedad. Así, por ejemplo, los estudios de epidemiología molecular han demostrado que la reactivación endógena puede ocurrir décadas después de haberse producido la infección inicial (Lillebaek *et al.*, 2002). Al mismo tiempo, los métodos moleculares han permitido discriminar los aislados del MTBC en diferentes escenarios: a) en el contexto «macropoblacional», como ya hemos visto en apartados anteriores, para definir la distribución internacional de linajes del MTBC o analizar aspectos evolutivos; b) en el contexto «micropoblacional», para identificar grupos de pacientes infectados por una misma cepa (transmisión reciente); c) en el paciente, para diferenciar recaídas por reactivaciones de la enfermedad (recidivas) o reinfecciones exógenas; así como para distinguir casos con infecciones mixtas; y d) en el laboratorio, para reconocer eventos de contaminación cruzada (García de Viedma *et al.*, 2011).

9.1. Transmisión reciente

Debido al largo período de incubación de la TB, la transmisión reciente se ha definido como el contagio que se ha producido en los últimos 2-5 años (Glynn *et al.*, 1999a; Borgdorff *et al.*, 2005). Teniendo esto en cuenta, gracias a la epidemiología molecular se ha demostrado que la importancia de la enfermedad recién adquirida en muchos entornos era superior de lo que se suponía. Asimismo, se han podido analizar los factores de riesgo asociados a la infección reciente y detectar escenarios de transmisión «no convencionales», como bares, clubes sociales, iglesias, etc. (McNabb *et al.*, 2004). Entre los factores de riesgo asociados con la transmisión reciente encontramos: el sexo masculino, ser adulto de poca edad, ser nativo (frente a nacidos en el extranjero), residir en zonas urbanas, el consumo excesivo de alcohol y el abuso de drogas, la falta de hogar, la exposición a ambientes muy concurridos (incluidos los centros penitenciarios) y la localización pulmonar (Alland *et al.*, 1994; Small *et al.*, 1994; van Soolingen *et al.*, 1999; Geng *et al.*, 2002; Diel *et al.*, 2004; Fok *et al.*, 2008; Love *et al.*, 2009; Nava-Aguilera *et al.*, 2009; Rodwell *et al.*, 2012; Sloot *et al.*, 2013). La infección por el VIH y la TB-MR se encontraron como factores de riesgo en algunos lugares, pero no en otros (Nava-Aguilera *et al.*, 2009).

En entornos con alta incidencia de TB, la transmisión reciente es la responsable de la mayoría de los casos de enfermedad y muchos de estos eventos de transmisión tienen lugar fuera de los hogares (Verver *et al.*, 2004). Por su parte, hasta la década de 1990, se creía que, en los países de baja incidencia, muchos de los casos se debían a la reactivación endógena de una infección latente y solo una pequeña proporción, aproximadamente del 10 %, se atribuía a la infección recién adquirida (Horwitz, 1973; Styblo, 1990). Sorprendentemente, dos estudios de referencia en los que se trabajó con pacientes que residían en entornos de baja incidencia, hallaron, mediante el análisis del

RFLP, una proporción inesperadamente alta de enfermedad atribuible a eventos de transmisión reciente. En estos trabajos se encontró que en Nueva York y San Francisco más del 30 % de los casos de TB se debieron a una infección reciente (Alland *et al.*, 1994; Small *et al.*, 1994). Sin embargo, algunos estudios han cuestionado la idoneidad del RFLP, y el marcador IS6110, para medir la carga de transmisión reciente en una comunidad (Alito *et al.*, 1999; Gillespie *et al.*, 2000; Diel *et al.*, 2002). Por ejemplo, en una población rural de Arkansas, resultó imposible identificar los vínculos epidemiológicos entre la mayoría de los casos agrupados, en particular cuando se trataba de personas mayores (Braden *et al.*, 1997a). En cambio, en los Países Bajos se demostró que hasta en un 86 % de los casos agrupados existía una probable relación epidemiológica (van Deutekom *et al.*, 2004).

En cualquier caso, una de las principales preocupaciones en la mayoría de los estudios de epidemiología molecular es la pobre correlación entre los resultados moleculares y los datos epidemiológicos (García de Viedma *et al.*, 2011). Para resolver esta falta de correlación, algunos autores han utilizado enfoques innovadores. Una de las estrategias empleadas ha sido mantener entrevistas con los pacientes para ampliar la cantidad y calidad de los datos epidemiológicos obtenidos en los estudios de contactos convencionales. Con las respuestas a cuestionarios detallados, también se consigue información del entorno social de los pacientes (Fitzpatrick *et al.*, 2001; Klovdahl *et al.*, 2001; Barniol *et al.*, 2009), es decir, de los llamados «contactos ocasionales»: personas a las que pueden haber transmitido el agente patógeno fuera de la familia. Se ha demostrado que existen otros enlaces (amigos, vecinos, conocidos con los que se comparten actividades de ocio, etc.) que habitualmente no se detectan con la epidemiología clásica, pero que, junto con las conexiones laborales, representan casi la misma proporción de casos por transmisión reciente que los eventos ocurridos dentro

del hogar (Borrell *et al.*, 2009). Estudios realizados en distintos contextos epidemiológicos han demostrado que dentro de la misma unidad familiar, una proporción sustancial de sus miembros, el 30 % en San Francisco (Behr *et al.*, 1998) y el 54 % en Ciudad del Cabo (Verver *et al.*, 2004), estaban infectados con cepas diferentes. Si no se hubiese realizado un análisis molecular, la epidemiología tradicional lo habría atribuido a la transmisión dentro del hogar. Otra de las fórmulas empleadas en estos trabajos, consiste en usar fotografías de los pacientes como herramienta para establecer vínculos epidemiológicos a través del reconocimiento visual de otros casos relacionados (Weis *et al.*, 2002; Perri *et al.*, 2011). Cuando se ha aplicado este procedimiento, los pacientes agrupados reconocieron más fotografías de los individuos de su grupo que de otros y fue posible identificar lugares públicos donde probablemente la transmisión de la TB se viese favorecida. Algunos autores han integrado el uso de fotografías con la aplicación de cuestionarios detallados. Esto ha permitido identificar contextos de transmisión que no habían sido reconocidos, aumentando así el porcentaje de casos agrupados con vínculos demostrados (Martínez-Lirola *et al.*, 2008). La aplicación de estas estrategias ha conseguido que exista una alta correlación entre la epidemiología molecular y la convencional (van Deutekom *et al.*, 2004).

Una clara evidencia de la necesidad de este tipo de estudios se puede observar en los análisis epidemiológicos que se llevan a cabo en algunos países y que permiten diseñar políticas específicas contra la TB. Es importante poder distinguir si, en una región determinada, la enfermedad se debe a una infección reciente o a la reactivación endógena. Si se demuestra que la transmisión reciente es significativa, será necesario intensificar las medidas de búsqueda activa de casos y su tratamiento. Si, por el contrario, la causa principal es la reactivación de una infección latente, deberán aplicarse medidas para prevenir que la enfermedad se desarrolle (García-Pachón y

Rodríguez, 2005). Para comprobar la trascendencia de estos matices, un estudio en Hong Kong (Vynnycky *et al.*, 2008) estimó que la tasa de reactivación endógena entre los hombres de edad avanzada puede ser hasta 17 veces superior en esa región que en el Reino Unido. El alto riesgo de que la enfermedad se desarrolle a través de la reactivación endógena, puede tener importantes implicaciones en la evolución de la incidencia de la enfermedad. Por ello, los autores concluyeron que para controlar la TB en Hong Kong se necesitará algo más que la «simple» aplicación de medidas destinadas a interrumpir la transmisión de la enfermedad activa (Vynnycky *et al.*, 2008). Para controlar la TB, no solo en Hong Kong, será preciso realizar un diagnóstico precoz de las personas con mayor riesgo e identificar a esos individuos antes de que se produzca la reactivación, para poder tratarlos con medicamentos que sean realmente eficaces contra la infección...«latente», «inactiva», «quiescente», «en reposo» o «persistente» (según prefiera el lector). Por tanto, trabajos como este han de servir para que, cuando menos, se reconsideren las estrategias de lucha contra la TB en todo el mundo, puesto que los riesgos encontrados en Hong Kong (carencias nutricionales en la población hasta la década de 1950, alta prevalencia de silicosis durante la década de 1990, aumento de las enfermedades asociadas al envejecimiento debido al incremento de la esperanza de vida, etc.) pueden estar presentes también en otros países asiáticos. Teniendo en cuenta que más del 50 % de la carga mundial de TB se encuentra en Asia, es posible que para conseguir los objetivos marcados para el año 2050 sea indispensable ajustar las medidas de lucha a los factores socioeconómicos, demográficos y ambientales propios de cada población.

9.2. Tuberculosis recurrente: ¿recidiva o reinfección?

La recurrencia puede ser el resultado de la reactivación de un episodio previo de TB o de una nueva infección por cepas diferentes. Hasta la llegada de las herramientas moleculares, no estaba clara la contribución de la reinfección exógena a la carga de enfermedad recurrente. Pero un conocido estudio con pacientes de Ciudad del Cabo (van Rie *et al.*, 1999), demostró que la reinfección exógena podía ser una importante causa de recaída en pacientes que han completado con éxito el tratamiento antituberculoso. Entre los 16 pacientes con TB recurrente, 12 (75 %) tenían una cepa con un perfil RFLP diferente al del primer aislamiento. Con estos datos quedó probada la importancia epidemiológica de la reinfección exógena en un entorno de alta incidencia de TB, como Sudáfrica o China. En este último país, concretamente en Shanghái, otra investigación reveló que en el 61.5 % de los pacientes con episodios repetidos de enfermedad se había producido una nueva infección con otra cepa distinta (Shen *et al.*, 2006). De igual forma, diversos trabajos con pacientes de Sudáfrica (Sonnenberg *et al.*, 2001), Malaui (Crampin *et al.*, 2010) e India (Narayanan *et al.*, 2010), en los que además se pudo valorar el efecto de la infección por el VIH como factor de riesgo, demostraron que los casos recurrentes que resultan de una nueva infección por cepas diferentes son particularmente comunes entre los pacientes con sida. No obstante, la terapia antirretroviral reduce el riesgo de recaída entre estos enfermos (Houben *et al.*, 2012).

Aunque se necesitan más estudios, algunos hallazgos recientes basados en la WGC sugieren que la reinfección exógena puede estar causada por la falta de protección inmunológica (Bryant *et al.*, 2013a). Por tanto, conocer los casos de reinfección exógena es importante por varias razones, entre otras, para mejorar nuestra comprensión sobre el papel que desempeña la inmunidad adquirida en este proceso patológico, lo

cual podría ser fundamental para el desarrollo de vacunas más eficaces (Borgdorff y van Soolingen, 2013). Esta inmunización, por otra parte, será especialmente oportuna en los individuos que ya han padecido TB clínica, pues varios estudios han demostrado que en zonas de alta incidencia, si estas personas se vuelven a infectar, tienen mayor riesgo que el resto de la población de presentar nuevamente TB activa (Verver *et al.*, 2005; Glynn *et al.*, 2010; Lahey *et al.*, 2013). Igualmente, se ha observado que en los entornos con baja incidencia de TB también es más frecuente que la enfermedad vuelva a aparecer en las personas que tienen un historial previo de clínica tuberculosa (Millet *et al.*, 2013).

De todos modos, en esos países con baja carga de TB, como los EE. UU., Canadá, España, Australia o Dinamarca, la enfermedad recurrente es mucho menos común y rara vez es atribuible a la reinfección exógena (Jasmer *et al.*, 2004; Cacho *et al.*, 2007; Dobler *et al.*, 2009; Bang *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha demostrado que la contribución relativa de la reinfección exógena a la carga de TB recurrente en algunas de estas zonas de baja incidencia es mucho mayor de lo que se creía (Bandera *et al.*, 2001; Caminero *et al.*, 2001; García de Viedma *et al.*, 2002). En 12 años de investigación en el Hospital Gregorio Marañón de Madrid, García de Viedma *et al.* (2002) observaron que 14 (33 %) de los 43 pacientes con TB recurrente presentaban una cepa de *M. tuberculosis* diferente a la del primer episodio. Muchos de esos pacientes no se habían adherido a la terapia antituberculosa durante su primer episodio y, aun así, presentaron una cepa distinta. En estos casos se rechazó a la reactivación endógena como origen de la recaída. Los autores del estudio concluyeron que la reinfección exógena no debe ser descartada como causa de TB recurrente incluso cuando no se dan las circunstancias clínico-epidemiológicas propicias para que se favorezca el desarrollo de una nueva infección.

9.3. Infecciones mixtas

Numerosos estudios moleculares han demostrado que un paciente puede contener simultáneamente varias cepas diferentes de *M. tuberculosis*. El fenómeno de las infecciones mixtas³¹ no es exclusivo de *M. tuberculosis*, y se ha observado con agentes patógenos de todo tipo (Balmer y Tanner, 2011). Como se puede observar en la figura 15, existen varios mecanismos por los que potencialmente podría existir una población heterogénea de cepas de *M. tuberculosis* dentro de un hospedador: (a) una persona puede infectarse al mismo tiempo por múltiples cepas o (b) puede volver a infectarse con cepas distintas; (c) la diversidad genética en la población bacteriana puede surgir también de manera espontánea durante el curso de la infección (Ford *et al.*, 2012). Se estima que entre el 10 y el 20 % de los pacientes con TB están infectados con múltiples cepas. Esto indica que las infecciones mixtas son muy comunes y es probable que se haya subestimado su importancia en la epidemiología de la TB (Cohen *et al.*, 2012).

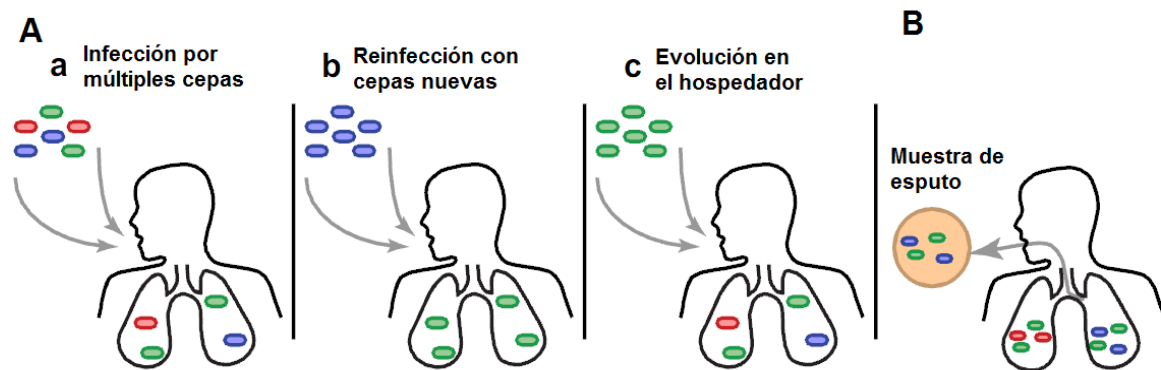


Figura 15: Ilustración de las posibles causas de infecciones mixtas. [A] La presencia de múltiples cepas en un hospedador complica el estudio de la diversidad genética y hace que tanto el diagnóstico como el tratamiento de la TB sea más difícil. Hay varios mecanismos potenciales por los cuales podría existir heterogeneidad de cepas dentro del huésped: (a) infección por múltiples cepas a la vez, (b) reinfección exógena con cepas nuevas, o (c) mutación de cepas durante el curso de la infección. [B] Los resultados experimentales sugieren que las lesiones pueden estar causadas por cepas genéticamente distintas y pueden ser independientes, de tal manera que las bacterias en la muestra procedente de una lesión pueden no representar la verdadera diversidad genética presente en el paciente. Por lo tanto, las muestras de esputo son propensas a subestimar la verdadera diversidad de cepas existente en un solo individuo, ya que las bacterias presentes en lesiones cavernosas son las que generalmente aparecen en las muestras de esputo, aunque durante un muestreo seriado es posible detectar cepas en el esputo procedentes de lesiones diferentes. Adaptado de Ford *et al.* (2012).

³¹ En este apartado utilizaremos el concepto de infección mixta para referirnos de forma general a la presencia simultánea de más de una cepa (o variante clonal) en un individuo.

A pesar de las limitaciones de los métodos actuales de caracterización molecular, debido a su escasa sensibilidad para detectar la presencia de más de un tipo de cepa a la vez, se ha sugerido que la infección mixta puede ser la verdadera causa del fracaso terapéutico en pacientes en los que coexisten cepas resistentes a los antibióticos de primera línea junto con otras sensibles a esos fármacos (Theisen *et al.*, 1995; Niemann *et al.*, 2000; Baldeviano-Vidalón *et al.*, 2005; van Rie *et al.*, 2005). Fallo que habitualmente es atribuido a una nueva infección con cepas resistentes (Cox *et al.*, 2008). En ese sentido, van Rie *et al.* (2005) describieron un claro ejemplo del impacto negativo que tiene en el paciente la presencia de múltiples cepas, al detectar, mediante cultivos seriados de esputo, cambios en los patrones de susceptibilidad a los fármacos antituberculosos. Los investigadores observaron que, durante el período de tratamiento inicial, los antibióticos de primera línea redujeron la subpoblación de cepas sensible a los medicamentos, al tiempo que la subpoblación de cepas resistente fue capaz de persistir y crecer; convirtiendo así a un paciente con TB, aparentemente, susceptible a los fármacos en un caso de TB-MR. Tras un cambio de régimen terapéutico, el tratamiento con antibióticos de segunda línea condujo a la reaparición de la subpoblación de cepas sensible. Esto representa un mecanismo de selección a través de la presión antibiótica, en el que el tratamiento determina la población de cepas dominante en los pacientes con infección mixta. Utilizando un modelo matemático sencillo se ha observado que el uso generalizado de la terapia preventiva con isoniacida en personas coinfectadas con cepas sensibles y resistentes, puede favorecer la aparición de resistencia a los medicamentos al seleccionar la subpoblación de cepas resistente a la isoniacida (Colijn *et al.*, 2009).

Por otro lado, en los ensayos clínicos que evalúan nuevos fármacos contra la TB, el fracaso del tratamiento suele ser indicio de un pobre rendimiento terapéutico del

medicamento examinado. No obstante, si durante la fase de evaluación en pacientes no se diferencia adecuadamente la ineficacia de los nuevos fármacos de los casos en los que el fallo tenga su origen en una infección mixta, los medicamentos evaluados pueden ser descartados erróneamente (Niemann *et al.*, 2009).

Además de la capacidad que parecen tener las infecciones mixtas para deformar los resultados del tratamiento y comprometer la eficacia terapéutica, también se sospecha que una infección posterior, algún tiempo después del contacto inicial con el agente patógeno, puede provocar la reactivación endógena de la infección primaria, favoreciendo la progresión de la enfermedad (du Plessis *et al.*, 2001). Pese a que el papel de la reinfección exógena en la progresión de la TB no está claro todavía, se ha sugerido que una infección secundaria con la cepa de la vacuna BCG puede aumentar el riesgo de desarrollar TB en pacientes que tengan una infección tuberculosa previa (Fine, 2001). Esto implica que el proceso de vacunación (equivalente a una infección secundaria) altera el estado inmune del huésped, permitiendo a *M. tuberculosis* multiplicarse activamente y causar la enfermedad (Moreira *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2003). Por otra parte, es probable que la infección primaria, en lugar de conferir protección contra una segunda infección, promueva un estado de inmunodepresión en el individuo; siendo más fácil la reinfección con una nueva cepa, incluso cuando la infectividad de esta segunda es menor (Martín *et al.*, 2011). A una conclusión similar se llegó empleando modelos experimentales con ratones después de infecciones seriadas con diferentes cepas (Repique *et al.*, 2002; Mollenkopf *et al.*, 2004) o infecciones repetidas con la misma (Henaó-Tamayo *et al.*, 2012). Además, se ha sugerido que la reinfección se debe a que la infección primaria no ofrece una protección suficiente contra cepas genéticamente alejadas, algo a tener en cuenta para el diseño de futuras vacunas (Bryant *et al.*, 2013a).

9.4. Detección de contaminación cruzada

La identificación de cultivos falsos positivos como resultado de una contaminación cruzada en el laboratorio ha sido ampliamente documentada desde que se comenzara a aplicar el análisis genotípico en el estudio de la TB (Small *et al.*, 1993; Alland *et al.*, 1994; Bauer *et al.*, 1997; Braden *et al.*, 1997b; Jasmer *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2013). Aunque una investigación en París reveló que el 7.8 % de los cultivos de TB eran falsos positivos debido a la contaminación cruzada (Gutiérrez *et al.*, 1998), lo habitual es que no represente un problema común en la práctica rutinaria de los laboratorios (Ruddy *et al.*, 2002), con tasas que varían entre el 0.1 (Bhattacharya *et al.*, 1998) y el 3 % (Frieden *et al.*, 1996). Esas tasas pueden ser mayores cuando se realiza una investigación por sospecha de contaminación cruzada (Nitta *et al.*, 1996; Burman *et al.*, 1997); como ocurrió en un laboratorio de referencia de micobacterias de Brasil, donde el 65.9 % de los cultivos positivos se atribuyeron a un error en el laboratorio. La fuente más probable de la contaminación fue un reactivo utilizado en el procesamiento de las muestras (Ramos *et al.*, 1999).

Cuando el resultado de la baciloscopia de las muestras es negativo, solo hay un cultivo con crecimiento y la clínica no apoya el diagnóstico de TB (Burman y Reves, 2000; Ruddy *et al.*, 2002), si, además, el genotipo del caso de dudosa significación clínica se corresponde con la cepa de un paciente bacilífero, cuya muestra ha sido manipulada en el laboratorio el mismo día, es muy probable que se haya producido una contaminación cruzada (García-Pachón y Rodríguez, 2005). En este contexto, la sustitución de una técnica relativamente lenta como el RFLP por el MLVA debería asegurar un análisis más rápido y optimizado que, al mismo tiempo, ayudase a la detección temprana de estos casos (Martín *et al.*, 2008). A su vez, es de suma importancia que exista una interrelación entre los médicos que reciben los resultados

dudosos y el laboratorio (van Duin *et al.*, 1998). Por otra parte, también se han evidenciado casos falsos positivos a partir del cultivo de muestras recogidas con un broncoscopio contaminado (Michele *et al.*, 1997; Ramsey *et al.*, 2002; Larson *et al.*, 2003; Schoch *et al.*, 2003).

Estos errores pueden conducir a una equivocación en el diagnóstico, con graves consecuencias tanto para la salud del paciente como para el resto de la población; entre otras cuestiones, por los gastos innecesarios derivados de tratamientos, hospitalizaciones y pruebas diagnósticas (de Boer *et al.*, 2002). El coste económico asociado a cada caso mal diagnosticado de TB se ha estimado en 10873 dólares (Northrup *et al.*, 2002). Por otro lado, la contaminación cruzada también puede alterar los resultados de los estudios de epidemiología molecular, provocando una sobreestimación de las tasas de transmisión reciente; especialmente si el análisis genotípico se realiza en centros de referencia y la comunicación con el laboratorio de diagnóstico es escasa (Martínez *et al.*, 2006).

9.5. Cuestiones abiertas

Aunque se han hecho grandes progresos en la epidemiología molecular de la TB en las últimas dos décadas, muchas preguntas permanecen aún sin respuesta. En este sentido, deberán identificarse las cadenas de transmisión dentro de los grupos de pacientes que presentan perfiles idénticos de RFLP y MLVA. También será fundamental la identificación de los determinantes de la estabilidad genética, la mejora de la cuantificación de la infección mixta, la determinación de las probabilidades de transmisión y las tasas de progresión de infección a enfermedad. Igualmente, será necesaria una mejor comprensión de la influencia del genotipo de *M. tuberculosis* en la presentación clínica de la enfermedad y su asociación con algunas poblaciones.

Asimismo, será preciso determinar la validez de las nuevas pruebas para diagnosticar la infección latente y la probabilidad de fracaso del tratamiento o recaída en asociación con la cepa de *M. tuberculosis* implicada, así como la eficacia de las nuevas vacunas. Pero tal vez la pregunta más importante afecta a la evolución de la estructura de la población de *M. tuberculosis* y los factores genéticos que intervienen en la selección de cepas. Si se demuestra que la epidemia mundial de TB se está convirtiendo en una epidemia de TB-MR, es posible que se invierta el éxito alcanzado hasta ahora en el control de la enfermedad y nos encontraremos ante una plaga que se habrá reinventado a sí misma (Borgdorff y van Soolingen, 2013). Durante esta revisión bibliográfica hemos contado cómo el largo camino de una enfermedad cuya historia comenzó hace miles de años continúa aún en la actualidad; que la capacidad invasiva de su agente etiológico es tal, que ha sabido sortear las barreras que el hombre le ha puesto en su afán por combatirla; pero quizá lo más inquietante de todo es que todavía no sabemos con claridad cuánto tiempo tendrá que transcurrir para que la humanidad se libere definitivamente de ella. Si en apartados anteriores solicitábamos permiso para escatimar en menciones, ahora pedimos la comprensión del lector por el derroche en alusiones históricas, pero como decía el Dr. Carl Sagan: «hay que conocer el pasado para comprender el presente» (Donoghue, 2011). Puede que en el caso de la TB, tal comprensión pase ineludiblemente por seguir ahondando en la ya célebre teoría de la coevolución entre el huésped y el agente patógeno. Esto ayudará, según algunos doctos, a desarrollar mejores estrategias, y herramientas más eficaces, que nos permitan vencer por fin a la enfermedad que más sufrimiento ha causado en la historia de la humanidad; que es, en definitiva, lo que todos los que nos dedicamos a su estudio, humildemente, perseguimos.

Parte II
Diversidad genética de *Mycobacterium*
***tuberculosis* en Extremadura, España:**
un estudio retrospectivo (1998-2012)

10. Determinación de la estructura poblacional de *Mycobacterium tuberculosis* en Extremadura basada en el espoligotipado

RESUMEN

En España, hay muchas regiones, entre ellas Extremadura, en las que se desconoce cuáles son las cepas de *M. tuberculosis* predominantes dentro de la comunidad y su evolución. En nuestro trabajo, hemos utilizado el espoligotipado para determinar el genotipo de 436 aislados clínicos con el objetivo de definir la estructura genética de la población de cepas de *M. tuberculosis* aisladas en Extremadura. En total se distinguieron 108 genotipos, 62 de los cuales se identificaron en un solo aislado. Los resultados se compararon con los de la base de datos internacional SITVITWEB. 19 perfiles de espoligotipo (n = 28) no estaban definidos en esta base de datos y cinco (n = 9) aparecían bajo la denominación «ORPHAN». El resto de aislados (n = 399) se clasificaron en 84 SIT. La familia predominante fue la LAM (29.13 %), seguida de la T (24.31 %) y la H (23.62 %). La incidencia de la familia Beijing es muy baja en Extremadura y no hay evidencia de transmisión o mayor virulencia. Las subfamilias H3 (19.04 %), LAM9 (17.20 %) y T1 (14.45 %) fueron las más prevalentes; mientras que los espoligotipos más comunes fueron: SIT42 (11.01 %), SIT50 (10.78 %) y SIT106 (6.64 %). Los resultados obtenidos mediante el espoligotipado muestran una elevada diversidad genética entre las cepas de *M. tuberculosis* que causan la TB humana en Extremadura, con un claro predominio de las familias que se corresponden con el linaje Euro-americano.

ABSTRACT

As in many other regions in Spain, the population structure of the *M. tuberculosis* strains circulating in Extremadura has not been previously described. In this work, 436 clinical isolates of *M. tuberculosis* were genotyped by spoligotyping. A total of 108 distinct genotypes were identified, 62 of them represented as unique isolates. Results were compared with those recorded in the international database SITVITWEB. 19 spoligotype profiles (n = 28) were new, not previously recorded in this database, and five (n = 9) had been yet recorded under the name “ORPHAN”. The remaining isolates (n = 399) were classified into 84 SIT. The predominant family was LAM (29.13 %), followed by T (24.31 %) and H (23.62 %). The incidence of Beijing family is very low in Extremadura and no evidence was found of its transmission or increased virulence. The sub-families H3 (19.04 %), LAM9 (17.20 %) and T1 (14.45 %) were the most prevalent; while the most common spoligotypes were SIT42 (11.01 %), SIT50 (10.78 %) and SIT106 (6.64 %). The results showed a high degree of genetic diversity among *M. tuberculosis* strains causing human TB in Extremadura, with a clear predominance of the families included in the Euro-american lineage.

INTRODUCCIÓN

A pesar de los avances alcanzados en las últimas décadas, la TB continúa siendo un problema global de Salud Pública. En los países desarrollados, la enfermedad se está concentrando en poblaciones vulnerables, como los inmigrantes y otros colectivos en riesgo de exclusión social. La adecuación de las medidas de control al contexto específico de cada región y la revisión continua de los programas de lucha contra la TB son imprescindibles para conseguir la eliminación de la enfermedad (Orcau *et al.*, 2011). Para adaptar con éxito estas estrategias es importante identificar qué cepas son

las que predominan en una comunidad y cómo varían con el tiempo. En España, los estudios de genética de poblaciones con aislados clínicos del MTBC de origen humano son muy escasos (García de Viedma *et al.*, 2005b). Por ello, creímos oportuno determinar el genotipo de la totalidad de aislados de *M. tuberculosis* disponibles en el Laboratorio de Microbiología del Complejo Hospitalario de Cáceres (Extremadura, España) entre 1998 y 2012. El método empleado inicialmente para la caracterización molecular de los 436 aislados clínicos aprovechables para este análisis fue el espiligotipado. Entre los métodos de tipificación utilizados para la determinación de la diversidad genética de *M. tuberculosis*, el espiligotipado tiene la ventaja de ser simple, barato y altamente reproducible (Kremer *et al.*, 1999). Además, los datos obtenidos se pueden comparar fácilmente con los de otros laboratorios gracias a la existencia de bases de datos internacionales, como SITVITWEB (Demay *et al.*, 2012). Todo esto ha hecho que el espiligotipado se convierta en el método más práctico para clasificar los aislados de *M. tuberculosis* dentro de los principales linajes en una región determinada.

La utilización de diversas técnicas de tipificación ha provocado que la nomenclatura empleada en la taxonomía del MTBC no sea única e inequívoca; de tal manera que los linajes (familias) de la clasificación basada en el espiligotipado (Sola *et al.*, 2001a; Sola *et al.*, 2001b; Filliol *et al.*, 2002; Filliol *et al.*, 2003; Sola *et al.*, 2003; Brudey *et al.*, 2006; Demay *et al.*, 2012) se pueden considerar «sublinajes» incluidos dentro de los principales linajes definidos mediante el análisis de las RD o los SNP (Gagneux *et al.*, 2006; Hershberg *et al.*, 2008; Comas *et al.*, 2009). De hecho, si se combinan ambos sistemas de clasificación (Kato-Maeda *et al.*, 2011), se puede observar como: (1) el linaje Océano Índico, que se caracteriza por la pérdida de la RD239, incluye dos grupos designados mediante el espiligotipado, por un lado estaría el linaje «EAI» (*East African Indian*), que presenta el espaciador 33 aunque carece de los

espaciadores 29-32 y 34, y por el otro la familia «MANU», que presenta todos los espaciadores menos el 34 (MANU1), 33 y 34 (MANU2) o 34-36 (MANU3); (2) el linaje Asia Oriental, al que le falta la RD105, contiene, según la clasificación basada en el espoligotipado, a las cepas de la familia Beijing y a un grupo de cepas asiáticas en las que están presentes todos los espaciadores; (3) el linaje India-África oriental, que no tiene la RD750, se corresponde con el linaje «CAS» (*Central Asian*), en el que están ausentes los espaciadores 4-7 y 23-34; (4) el linaje Euro-americano, que presenta una delección de 7 pb en el *locus pks 15/1*, incluye cinco grandes familias de espoligotipos: «T», «H» (*Haarlem*), «LAM» (*Latin American-Mediterranean*), «S» y «X»; finalmente, y aunque resulte paradójico, los linajes (5) África occidental 1, que se caracteriza por no tener la RD711, y (6) África occidental 2, que ha perdido la RD702, se corresponden, en la taxonomía basada en el espoligotipado, con el linaje «AFRI2» y el linaje «AFRI1», respectivamente (Gagneux y Small, 2007).

El objetivo de este trabajo fue definir la estructura genética de la población de cepas de *M. tuberculosis* aisladas en Extremadura, con la ayuda de una técnica de caracterización molecular simple y rápida como el espoligotipado, para obtener una mejor comprensión de las variantes genotípicas implicadas en la transmisión de la enfermedad. Como la inmigración es un fenómeno relativamente reciente en Extremadura, este estudio también puede contribuir a la comprensión de su influencia en la diversidad genética de *M. tuberculosis* en una región con baja prevalencia de TB.

MATERIALES Y MÉTODOS

Confidencialidad y aspectos éticos

El proyecto de investigación en el que se encuadra este trabajo contó con la aprobación de la Comisión de Bioética de la Universidad de Extremadura. Además, el Comité Ético de Investigación Clínica del Complejo Hospitalario de Cáceres también emitió un dictamen favorable. Los aislados que se incluyeron en este experimento proceden del cultivo bacteriológico de muestras clínicas de pacientes atendidos en hospitales del Servicio Extremeño de Salud como parte del diagnóstico habitual de TB que se realiza en los laboratorios de microbiología. La caracterización molecular de los aislados puede entenderse como un complemento de ese diagnóstico, por lo que el comité ético consideró que no era necesario el consentimiento informado de los pacientes. Durante la creación de las fuentes de información utilizadas se ha garantizado en todo momento la protección de la intimidad de los pacientes y el tratamiento confidencial de los datos personales conforme a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. La presentación de los datos se ha realizado de manera agregada, para impedir que se pueda identificar a un paciente a partir de la difusión de los mismos.

Población de estudio

El presente trabajo es parte de un estudio observacional retrospectivo de base poblacional que incluye todos los aislados del MTBC disponibles en el Laboratorio de Microbiología del Complejo Hospitalario de Cáceres entre enero de 1998 y mayo de 2012. En total, se determinó el genotipo de 450 aislados procedentes de pacientes atendidos en diferentes hospitales extremeños; aunque para el análisis de los resultados de este trabajo se han excluido nueve aislados del MTBC identificados como especies

diferentes de *M. tuberculosis*. Tampoco se han incluido cinco aislados de *M. tuberculosis* que estaban duplicados, es decir, había dos muestras de un mismo caso (paciente con TB activa en un momento puntual). Por tanto, en el presente trabajo, cada aislado se correspondería con un caso con cultivo positivo a *M. tuberculosis*.

Extremadura es una de las 17 comunidades autónomas que integran el Estado español. Está situada en el sudoeste de la península ibérica y tiene una extensión de 41634 km². Su población en 2012 fue de 1108130 habitantes, el 3.8 % extranjeros (Instituto de Estadística de Extremadura, 2012). Son elementos diferenciales de esta región: el predominio del mundo rural, la baja densidad de su población y su dispersión. Extremadura está dividida en ocho Áreas de Salud, cuatro en la provincia de Cáceres (Cáceres, Plasencia, Coria y Navalmoral de la Mata) y otras cuatro en la de Badajoz (Badajoz, Mérida, Don Benito-Villanueva de La Serena y Llerena-Zafra). Los aislados incluidos en el análisis se obtuvieron a partir del cultivo bacteriológico de muestras clínicas de pacientes con TB diagnosticados en todos los hospitales de la provincia de Cáceres: Complejo Hospitalario de Cáceres (Hospital San Pedro de Alcántara y Hospital Virgen de la Montaña), Hospital Virgen del Puerto (Plasencia), Hospital Ciudad de Coria (Coria) y Hospital Campo Arañuelo (Navalmoral de la Mata); así como en los hospitales del Área de Salud de Don Benito-Villanueva de La Serena (Hospital Don Benito-Villanueva y Hospital Siberia-Serena Este).

Cultivo de las muestras, identificación de *M. tuberculosis* y determinación de la sensibilidad antibiótica

Las diferentes muestras clínicas (esputo, otras secreciones respiratorias obtenidas por técnicas broncoscópicas, líquido pleural, jugo gástrico, muestras de aspirado ganglionar, etc.) se procesaron de acuerdo con los métodos de referencia (Alcaide Fernández de la Vega, F. *et al.*, 2005), y se cultivaron empleando los sistemas

automatizados para la detección de micobacterias en medios líquidos «MB/BacT» (bioMérieux, Craponne, Francia) y, más recientemente, «BD BACTEC™MGIT™960» (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, EE. UU.), conforme a las instrucciones de los fabricantes. Estos sistemas se utilizaron también para el análisis de sensibilidad a los fármacos de primera línea, ya que ambos métodos han sido validados para determinar la sensibilidad antimicrobiana de *M. tuberculosis* (Garrigó *et al.*, 2007). Los antibióticos testados han sido isoniacida, etambutol, estreptomina, rifampicina y pirazinamida. Los aislados de *M. tuberculosis* se identificaron mediante el uso del kit comercial «GenoType® MTBC» (VER 1.X), siguiendo las recomendaciones del fabricante (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Alemania). De igual forma, en algunos casos, se utilizó el kit «GenoType® MTBDRplus» (VER 1.0), que permite la identificación del MTBC y su resistencia a la rifampicina e isoniacida.

Extracción de ADN para el análisis genotípico

Para la extracción de ADN se procedió del siguiente modo: en primer lugar, se recogió 1 ml del medio de cultivo líquido con crecimiento bacteriano y se centrifugó a 12000 revoluciones por minuto (r. p. m.) durante 15 minutos. Posteriormente, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento con 1 ml de agua destilada estéril y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones; este lavado se repitió una vez más. A continuación, se resuspendió ese sedimento en 200 µl de agua ultrapura estéril. Esta suspensión se inactivó durante 10 minutos a 100 °C y, después de 5 minutos a temperatura ambiente, se introdujo durante otros 15 minutos en un baño de ultrasonidos. Por último, se centrifugó a 12000 r. p. m. durante 5 minutos. El ADN se conservó a una temperatura mínima de -20 °C hasta su utilización.

Espoligotipado

El análisis genotípico de los aislados de *M. tuberculosis* de origen humano se llevó a cabo en el Laboratorio de Micobacterias del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Extremadura. El espoligotipado se realizó siguiendo el protocolo descrito por Kamerbeek *et al.* (1997). La región DR se amplificó mediante una PCR en la que se utilizaron dos cebadores (Eurogentec, Seraing, Bélgica): DRa (GGTTTTGGGTCTGACGAC, marcado con biotina en el extremo 5') y DRb (CCGAGAGGGGACGGAAAC). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador «PCR Express» (Hybaid, Ashford, Inglaterra). El producto amplificado se hibridó en una membrana de nailon; en este experimento se han empleado dos tipos de membranas: una comercial (Ocimum Biosolutions, Hyderabad, India) y otra preparada en el laboratorio del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET, Madrid, España). El ADN hibridado se detectó con el conjugado de estreptavidina-peroxidasa (Roche Applied Science, Barcelona, España) y el sistema ECL (GE Healthcare, Barcelona, España). Como control positivo se usó ADN de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv (cedida amablemente por VISAVET) y como control negativo la mezcla de la reacción sin ADN de micobacterias.

La conversión del código binario de 43 caracteres (1 = presencia / 0 = ausencia del espaciador) al código octal de 15 dígitos se realizó con la ayuda de «spolTools» (<http://www.emi.unsw.edu.au/spolTools/>), que es una aplicación diseñada para manipular y analizar datos de espoligotipos (Tang *et al.*, 2008). Los resultados del espoligotipado se registraron de forma manual en una hoja de Excel (Microsoft Office), junto con otra información de interés como la fecha de aislamiento, el país de origen de los pacientes o la sensibilidad antimicrobiana; estos datos estaban disponibles en el archivo del Laboratorio de Microbiología del Complejo Hospitalario de Cáceres.

Definición y clasificación de los linajes y familias

La identificación de los perfiles de espoligotipo y su asignación dentro de las principales familias de *M. tuberculosis* se efectuó de acuerdo con la información disponible en la base de datos internacional SITVITWEB (Demay *et al.*, 2012). Para distinguir a los diferentes espoligotipos que, de forma general en esta base de datos, se designan con el nombre: «ORPHAN» (perfiles que se han encontrado en un solo aislado clínico de todos los recogidos en SITVITWEB), se les identificó con esa denominación en inglés seguida de un número de dos cifras. Por otro lado, los perfiles que no estaban incluidos en la base de datos consultada, se nombraron con la sigla «NSIT» (*no shared international type*) seguida también de un número de dos cifras. A los aislados con perfiles ORPHAN y NSIT se les repitió el análisis para confirmar los resultados. Debido a que en SITVITWEB algunos espoligotipos no tienen asignada una familia, decidimos utilizar «SPOTCLUST» (Vitol *et al.*, 2006), que está disponible en línea (http://tbinsight.cs.rpi.edu/run_spotclust.html), para clasificar tanto a estos espoligotipos como a los perfiles no registrados. Del mismo modo, se utilizó la aplicación «TB-Lineage» (http://tbinsight.cs.rpi.edu/run_tb_lineage.html) para determinar el principal linaje genético de los aislados de *M. tuberculosis* a partir de sus espoligotipos (Shabbeer *et al.*, 2012a).

Análisis filogenético

La comparación filogenética entre los genotipos se llevó a cabo usando el software InfoQuestTM FP (Bio-Rad, EE. UU.), con el que se elaboró un árbol de mínima expansión (*minimal spanning tree*, MST) y un dendrograma, basado en el índice de similitud de Dice y utilizando como algoritmo de agrupación el UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic average*). También se utilizó spolTools para elaborar un «árbol de espoligotipos».

RESULTADOS

Características de la población de estudio

Se analizaron los datos correspondientes a 436 aislados clínicos de *M. tuberculosis* coleccionados a lo largo de 14 años (fig. 16). El año 2000 (n = 43) fue del que más aislados se obtuvieron y 2006 (n = 22) del que menos (descartamos al 2012 por no ser un año de muestreo completo). El 6.42 % (n = 28) de esos aislados procedían de pacientes no nacidos en España; los países de origen fueron: Marruecos (n = 12), Rumanía (n = 7), Brasil (n = 2), China (n = 2), Perú (n = 2), Argelia (n = 1), Honduras (n = 1) y Portugal (n = 1). En cuanto a las pruebas de sensibilidad antibiótica, 21 aislados mostraron resistencia frente a la isoniacida, cuatro fueron resistentes a la estreptomina y uno al etambutol. Además, hubo dos casos de TB-MR: una cepa fue resistente a la estreptomina, rifampicina e isoniacida, mientras que otra cepa mostró resistencia frente a la estreptomina, rifampicina y etambutol.

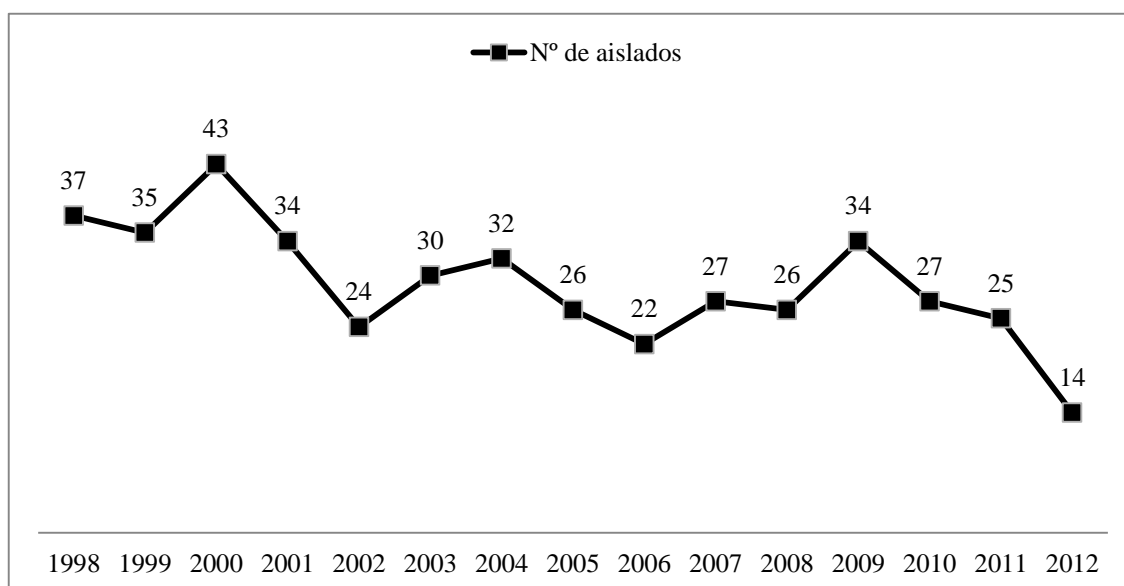


Figura 16: Distribución de los aislados clínicos del estudio por año de aislamiento.

Análisis de los datos del espoligotipado

Se han identificado 108 genotipos diferentes (tabla 5). Al comparar los espoligotipos de nuestras cepas con los de la base de datos del *Institut Pasteur de la Guadeloupe*, se observó que 19 perfiles de espoligotipo ($n = 28$) no estaban registrados en SITVITWEB («NSIT»). Además, había cinco espoligotipos ($n = 9$) que aparecían bajo la denominación «ORPHAN». Los 399 aislados restantes se clasificaron en 84 SIT. Por lo tanto, el 93.58 % ($n = 408$) de nuestros aislados presentaban espoligotipos incluidos en esta base de datos. Por otra parte, de los 436 aislados, 374 (85.78 %) se agruparon formando 46 grupos, que estaban integrados como mínimo por dos aislados con un mismo perfil de espoligotipo; en cambio, 62 (14.22 %) genotipos tan solo se identificaron en un aislado, y se consideraron cepas únicas (fig. 18). De los 46 grupos, cuatro tenían un espoligotipo que no estaba registrado en SITVITWEB: NSIT05 ($n = 4$), NSIT07 ($n = 2$), NSIT13 ($n = 4$) y NSIT19 ($n = 3$); por lo tanto, es posible que estos genotipos puedan ser específicos del ámbito de estudio.

El 79.82 % ($n = 348$) de los aislados se clasificaron como integrantes de alguna de las cinco grandes familias que se corresponden con el linaje Euro-americano: 127 aislados (29.13 %) pertenecían a la familia LAM, 106 (24.31 %) a la familia T, 103 (23.62 %) a la familia H, seis a la familia X (1.38 %) y otros seis a la familia S (1.38%). Las subfamilias H3, LAM9 y T1 fueron las más prevalentes (tabla 6). A su vez, cuatro aislados se clasificaron como miembros de la familia H37Rv (0.92 %) y otros tres pertenecían a la familia Beijing (0.69 %). La familia de los 81 (18.58 %) aislados restantes era desconocida (*unknown*, U) según SITVITWEB, por lo que se utilizó SPOTCLUST para su determinación (tabla 5). De acuerdo con TB-Lineage, los únicos espoligotipos que no pertenecían al linaje Euro-americano fueron: SIT1 y NSIT09 (linaje Asia oriental) por un lado, y por otro, SIT160 y NSIT14 (linaje Océano Índico).

Nombre	Perfil de espigotipo	Código octal	Familia*	Linaje**	Nº de aislados (%)
NSIT03	██████████	636177607760771	U (LAM3)	EA	1 (0.23)
SIT890	██████████	741774047560771	T1	EA	1 (0.23)
SIT124	██████████	77777777700771	U (H3)	EA	1 (0.23)
NSIT06	██████████	776177007760771	U (LAM3)	EA	1 (0.23)
SIT2511	██████████	777736770000000	U (Family34)	EA	1 (0.23)
SIT784	██████████	77637777760731	S	EA	1 (0.23)
SIT268	██████████	77777677720771	H3	EA	1 (0.23)
SIT751	██████████	07777777760771	T1	EA	1 (0.23)
SIT3	██████████	00000007720771	H3	EA	1 (0.23)
SIT746	██████████	77777777520771	H3	EA	1 (0.23)
SIT1278	██████████	03767777760771	T1	EA	1 (0.23)
SIT505	██████████	77773777760700	T3	EA	1 (0.23)
NSIT08	██████████	776177604020771	U (LAM8)	EA	1 (0.23)
SIT68	██████████	77577775760771	T5	EA	1 (0.23)
NSIT09	██████████	000000000000331	U (Beijing)	AO	1 (0.23)
SIT578	██████████	63777607760771	LAM1	EA	1 (0.23)
SIT254	██████████	777760007760771	T5-RUS1	EA	1 (0.23)
SIT789	██████████	67637777760771	S	EA	1 (0.23)
SIT450	██████████	777767700000000	U (Family34)	EA	1 (0.23)
SIT866	██████████	57777607760771	LAM9	EA	1 (0.23)
SIT60	██████████	77777607760731	LAM4	EA	1 (0.23)
SIT276	██████████	77777770060771	T1	EA	1 (0.23)
NSIT10	██████████	777753607760771	U (LAM9)	EA	1 (0.23)
SIT1541	██████████	376377607760771	LAM9	EA	1 (0.23)
SIT125	██████████	000000007760731	T2 / LAM3	EA	1 (0.23)
SIT34	██████████	77637777760771	S	EA	1 (0.23)
NSIT11	██████████	70000000760771	U (Family36)	EA	1 (0.23)
SIT1539	██████████	77377777720771	H3	EA	1 (0.23)
SIT4	██████████	000000007760771	U (Family36)	EA	1 (0.23)
SIT520	██████████	77777777760571	T1	EA	1 (0.23)
SIT1830	██████████	776177207760771	LAM3	EA	1 (0.23)
SIT2409	██████████	77773775760771	T3	EA	1 (0.23)
NSIT12	██████████	47777607560731	U (LAM9)	EA	1 (0.23)
SIT162	██████████	77777607760671	LAM9	EA	1 (0.23)
NSIT14	██████████	700777747413371	U (EAI5)	OI	1 (0.23)
SIT828	██████████	37777607760731	LAM4	EA	1 (0.23)
SIT78	██████████	77777777760711	T1	EA	1 (0.23)
NSIT15	██████████	77777557000771	U (H3)	EA	1 (0.23)
NSIT16	██████████	77777742160771	U (LAM10)	EA	1 (0.23)
SIT36	██████████	77773777720771	H3	EA	1 (0.23)
ORPHAN04	██████████	75777777660771	T1	EA	1 (0.23)
SIT602	██████████	77777770000771	U (H1)	EA	1 (0.23)
SIT388	██████████	73777607760771	LAM9	EA	1 (0.23)
SIT46	██████████	777777700000000	U (Family34)	EA	1 (0.23)
SIT283	██████████	77777704020771	H1	EA	1 (0.23)
SIT790	██████████	77637777740771	S	EA	1 (0.23)
SIT509	██████████	77777605760771	LAM9	EA	1 (0.23)
SIT64	██████████	77777607560771	LAM6	EA	1 (0.23)
SIT29	██████████	760001400000171	U (LAM7)	EA	1 (0.23)
SIT1229	██████████	77774377720771	H3	EA	1 (0.23)

Tabla 5: Espigotipos encontrados en los 436 aislados de *M. tuberculosis* analizados (continuación).

Continúa en la siguiente página

Nombre	Perfil de espoligotipo	Código octal	Familia*	Linaje**	Nº de aislados (%)
NSIT17	██████████	676340337760771	U (S)	EA	1 (0.23)
SIT1354	██████████	576177607760771	LAM3	EA	1 (0.23)
NSIT18	██████████	337773777760771	U (T1)	EA	1 (0.23)
SIT603	██████████	77777777320731	H3	EA	1 (0.23)
NSIT04	██████████	74000003760771	U (T3)	EA	1 (0.23)
SIT230	██████████	77777603760771	T1	EA	1 (0.23)
SIT99	██████████	75777777720771	H3	EA	1 (0.23)
SIT191	██████████	17777777760771	T1	EA	1 (0.23)

Tabla 5: Espoligotipos encontrados en los 436 aislados de *M. tuberculosis* analizados (continuación).

*U: familia indefinida en SITVITWEB, entre paréntesis se indica la familia según SPOTCLUST.

** EA: Euro-americano; OI: Océano Índico; AO: Asia Oriental.

Tanto en la figura 17 como en la figura S1 (disponible en el material suplementario aportado en formato digital) se muestran las relaciones filogenéticas entre los espoligotipos de *M. tuberculosis* identificados en Extremadura.

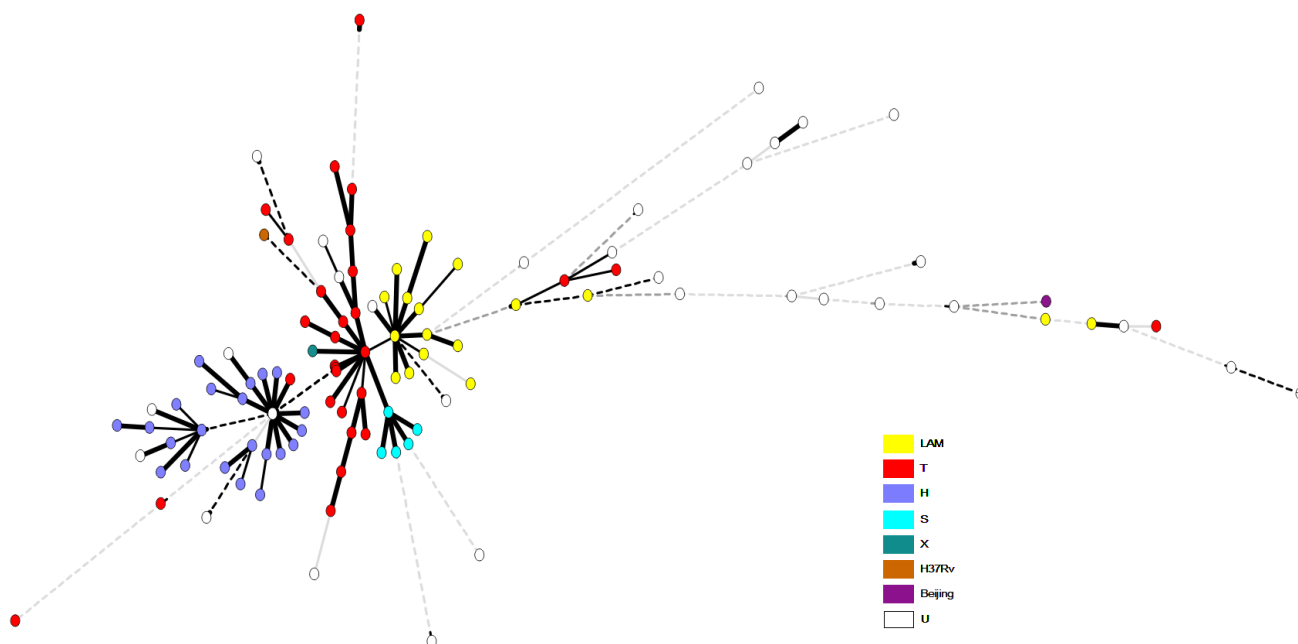


Figura 17: MST que muestra las relaciones filogenéticas entre los espoligotipos de *M. tuberculosis* identificados en Extremadura. El MST es una red no dirigida en el que todos los aislados están unidos entre sí con el menor número de vínculos posible entre los genotipos más relacionados. En él se resumen los vínculos filogenéticos entre dos genotipos diferentes por los cambios genéticos presentes en cada uno. La longitud de las ramas representa la distancia entre los perfiles, mientras que la forma de las líneas indica el número de espaciadores diferentes entre dos perfiles: líneas continuas, uno o dos cambios (las más gruesa representan un solo cambio, mientras que las más delgadas indican dos cambios); las líneas negras discontinuas representan tres cambios y las grises discontinuas cuatro o más cambios. El color de los círculos indica la familia (según la clasificación basada en el espoligotipado) a la que pertenece cada genotipo. Los círculos en blanco se corresponden con los genotipos cuya familia es desconocida (U) según la base de datos SITVITWEB. El coeficiente utilizado fue categórico.

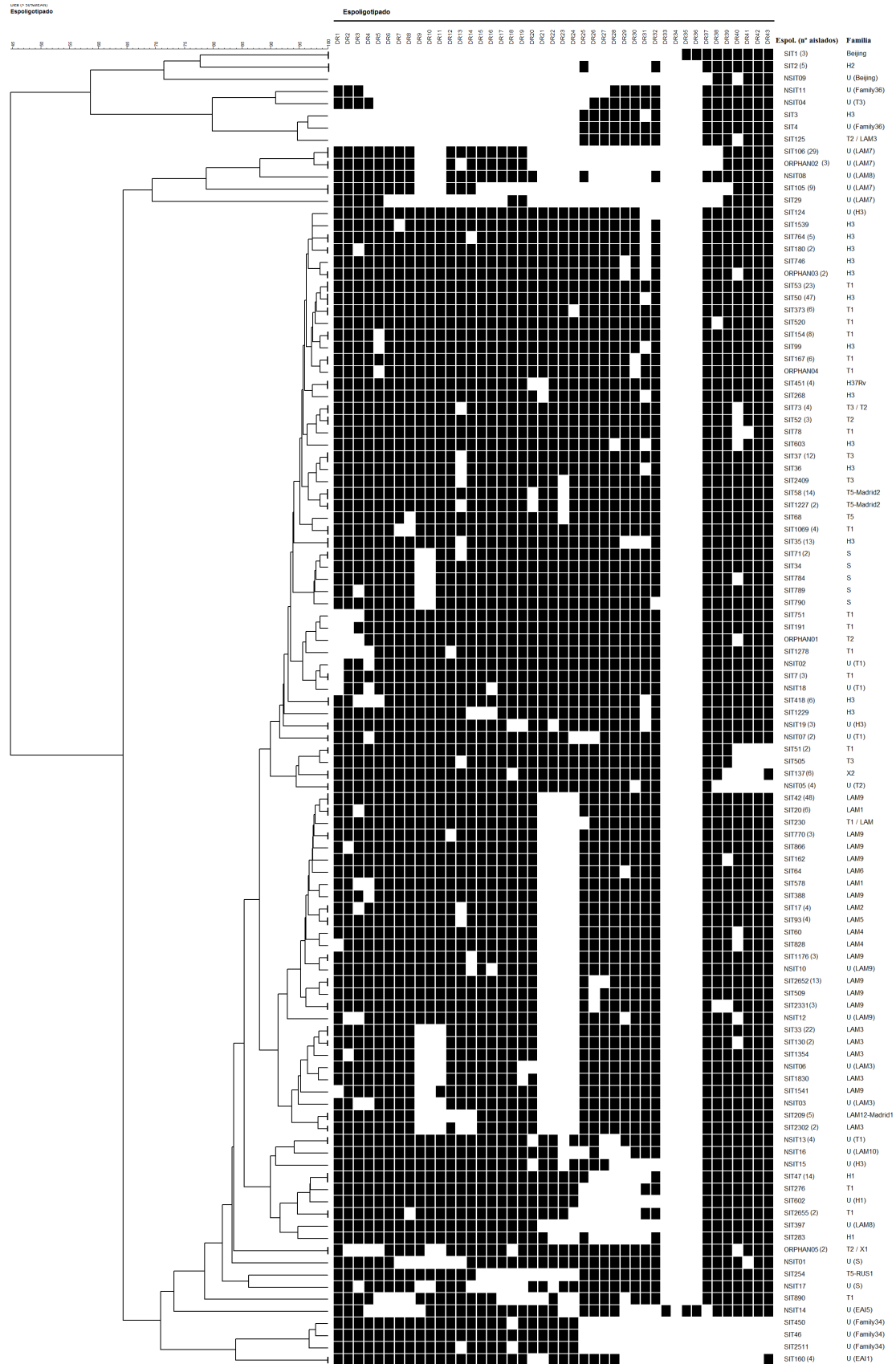


Figura 18: Dendrograma (simplificado) elaborado a partir de los espoligotipos encontrados en los 436 aislados de *M. tuberculosis* de Extremadura. La escala de la izquierda representa la distancia genética entre las cepas (100 = perfiles idénticos). A la derecha se indica el nombre del espoligotipo (entre paréntesis el número de aislados que presentan perfiles compartidos) y el nombre de la familia (U: familia indefinida en SITVITWEB, entre paréntesis se indica la familia según SPOTCLUST).

Familia	Subfamilia*	Nº de aislados	Porcentaje
LAM	LAM1	8	1.83
	LAM2	4	0.92
	LAM3	28	6.42
	LAM4	2	0.46
	LAM5	4	0.92
	LAM6	1	0.23
	LAM9	75	17.20
	LAM12-Madrid1	5	1.15
	T	T1	63
T2		7	1.61
T3		18	4.13
T5		1	0.23
T5-Madrid2		16	3.67
T5-RUS1		1	0.23
H	H1	15	3.44
	H2	5	1.15
	H3	83	19.04
X	X2	6	1.38
S		6	1.38
H37Rv		4	0.92
Beijing		3	0.69

Tabla 6: Familias de *M. tuberculosis* en la población de cepas extremeñas basada en la información de SITVITWEB. *En los casos que existía controversia (dos posibles subfamilias) se eligió la primera opción.

Los 11 espoligotipos predominantes en este estudio representaron el 55.96 % (n = 244) de los aislados analizados. Los más destacados fueron: SIT42 (n = 48 / 11.01 %), SIT50 (n = 47 / 10.78 %), SIT106 (n = 29 / 6.65 %), SIT53 (n = 23 / 5.28 %), SIT33 (n = 22 / 5.05 %) y SIT47 (n = 14 / 3.21 %). La mayor parte de estos espoligotipos eran también los más comunes en España (SIT53 [7.65 %], SIT50 [6.71 %], SIT42 [5.91 %], SIT33 [3.36 %] y SIT47 [3.22 %]) y Europa del Sur (SIT53 [10.59 %], SIT42 [7.74 %], SIT50 [6.11 %] y SIT47 [3.9 %]). Una relación de los perfiles compartidos por más de un 2 % de los aislados de nuestro estudio y su distribución geográfica según la base de datos SITVITWEB mostró que, exceptuando al SIT2652 (identificado únicamente en un aislamiento en Portugal y otro en Paraguay), la mayoría eran espoligotipos bastante comunes en todo el mundo, y se suelen encontrar con frecuencia en países de Europa y América (tabla 7).

SIT	Nº de aislados (%) en este estudio	Nº de aislados (%) en España	Nº de aislados en todo el mundo	Distribución geográfica en regiones con ≥ 5 % de un determinado SIT *	Distribución geográfica en países con ≥ 5 % de un determinado SIT **
42	48 (11.01)	50 (6.71)	2188	AMER-N:26.8; EURO-W:19.6; AMER-S:11.1; EURO-S:9.2; EURO-E:7.8	USA:26.78; AUT:9.41; ITA:6.03; CZE:5.67; BRA:5.48
50	47 (10.78)	44 (5.91)	1952	AMER-S:23.3; AMER-N:20; EURO-S:13.1; EURO-W:9.4	USA:19.98; BRA:11.99; ITA:8.5
106	29 (6.65)	11 (1.48)	60	AMER-N:38.3; AMER-S:26.7; EURO-S:18.3; EURO-W:8.3	USA:38.33; ESP:18.33; BRA:15; ARG:8.33; DZA:5; FXX:5
53	23 (5.28)	57 (7.65)	3812	AMER-N:21.7; EURO-W:16.1; AMER-S:9.8; EURO-S:9.2; ASIA-W:8.3; AFRI-S:6.3;	USA:21.3; ZAF:6.14; ITA:5.9; AUT:5.64; BRA:5.12
33	22 (5.05)	25 (3.36)	774	AFRI-S:38.4; AMER-N:20.3; AMER-S:19.3; EURO-S:8.9; EURO-W:7.1	ZAF:38.37; USA:20.28; BRA:9.95; ARG:7.36
47	14 (3.21)	24 (3.22)	1029	EURO-W:24; AMER-N:23.1; EURO-S:12.5; AMER-S:8.3; EURO-E:9	USA:22.64; AUT:12.24; ITA:8.16; BRA:5.93; CZE: 5.73
58	14 (3.21)	15 (2.01)	119	AMER-N:39.5; AMER-S:24.4; EURO-S:16; EURO-W:10.1	USA:39.5; BRA:12.61; ESP:12.61; ARG:6.72
35	13 (2.98)	1 (0.13)	92	EURO-W:20.7; ASIA-N:19.6; ASIA-W:18.5; EURO-E:10.9; EURO-N:9.8; AMER-N:8.7	RUS:19.57; AUT:14.13; USA:8.7; CZE:8.7; TUR:6.52; SAU:5.43
2652	13 (2.98)	0	2	AMER-N:50; EURO-S:50	PRY:50; PRT:50
37	12 (2.75)	0	243	EURO-W:18.9; AMER-N:17.3; ASIA-W:13.6; EURO-N:12.8; EURO-E:7; ASIA-S:6.2	USA:15.23; SAU:9.98; DNK:7; NLD:5.76
105	9 (2.06)	5 (0.67)	33	AMER-N:51.5; EURO-S:18.2; AMER-S:15.2; EURO-W:12.1	USA:51.52; BRA:15.15; ESP:15.15; FXX:6.06

Tabla 7: Relación de los espoligotipos predominantes (perfiles compartidos por más de un 2 % de los aislados) en este estudio, comparándolos con los aislados de España que presentan ese mismo número SIT y su distribución geográfica en todo el mundo según la información disponible en la base de datos SITVITWEB.

* Solo se muestra la distribución mundial de las regiones con una proporción de un SIT determinado igual o superior al 5 % en comparación con el número total de aislados con ese SIT en la base de datos SITVITWEB. La definición de las regiones geográficas coincide (excepto Rusia, que se considera una subregión por sí misma denominada: «Asia del Norte»; en lugar de incluirse en Europa del Este) con la realizada por las Naciones Unidas (<http://unstats.un.org/unsd/methods/m49/m49regin.htm>); donde los continentes: AFRI (África), AMER (América), ASIA (Asia) y EURO (Europa), se subdividen en: N (del Norte), S (del Sur), E (del Este) y W (del Oeste).

** Solo se muestra la distribución de aquellos países con una proporción de un SIT determinado igual o superior al 5 % en comparación con el número total de aislados con ese SIT en la base de datos SITVITWEB. Los nombres de los países están definidos por un código de tres letras (ISO 3166-1 alpha-3) disponible en <ftp://ftp.ripe.net/iso3166-countrycodes.txt> o en <http://unstats.un.org/unsd/methods/m49/m49alpha.htm>.

De los 108 espoligotipos caracterizados, 71 no se habían encontrado antes en España, o cuando menos no estaban registrados en SITVITWEB, aunque la mayoría de ellos se han identificado en países de Europa y América que tienen vínculos históricos con España; sirvan como ejemplo: SIT373 (República Checa, Austria e Italia), SIT2655 (Austria y Paraguay) o SIT51 (Austria, Italia y México). En el caso concreto de los perfiles que se han identificado en un solo aislado clínico en nuestro estudio, de los 62 espoligotipos observados, solamente en 11 de ellos (SIT1539, SIT1541, SIT29, SIT268, SIT746, SIT1278, SIT68, SIT60, SIT254, SIT34, SIT78) aparecía España como país de aislamiento; si bien, los dos únicos registros con el SIT1541 eran de aislamientos realizados en nuestro país, y también eran españoles siete de los ocho aislados registrados con el SIT1539. De los 51 espoligotipos únicos restantes que encontramos, no había registros españoles; pudiéndose destacar a varios de ellos por haberse identificado en pacientes extranjeros: SIT751, se identificó en un paciente de Marruecos (país donde se ha identificado uno de los 13 aislados registrados con ese SIT); SIT890, en un paciente de Honduras (EE. UU. era el país de aislamiento de los nueve aislados registrados); SIT602 y SIT1229, en pacientes rumanos (de Rumanía solo hay datos referentes a 88 aislamientos en la base de datos y estos SIT no se encontraban entre ellos); NSIT14, en un paciente brasileño; y NSIT16, en un paciente de Marruecos. También era originario de este país africano el paciente con TB recurrente al que pertenecían los tres aislados con SIT2331; de este espoligotipo solo existían tres aislados en SITVITWEB y en dos de ellos el país de origen de los pacientes también era Marruecos.

En cuanto a la familia Beijing, los tres aislados con SIT1 pertenecían a pacientes de China (n = 2) y Perú (n = 1). China fue el país de aislamiento de 24 de los 5800 aislados registrados con el SIT1, y era el país de origen de 127 pacientes en los que se

identificó este espoligotipo en investigaciones realizadas en otros países; en Perú, por su parte, se han identificado cuatro aislados con el SIT1 y fue el país de origen de 10 pacientes, dos de los cuales estaban en España cuando se realizó el aislamiento.

DISCUSIÓN

Nuestro estudio es el primer intento que se hace en Extremadura por conocer la estructura genética de la población de cepas de *M. tuberculosis*. Entre el año 2004 y 2012 se declararon en Extremadura 1119 casos de TB (Subdirección de Epidemiología del Servicio Extremeño de Salud, 2013); por lo tanto, nuestra muestra representa una parte relevante (aproximadamente el 25 %) del total de casos de TB en nuestra región. Los resultados del presente estudio revelan que los genotipos predominantes fueron: SIT42, SIT50, SIT106 y SIT53. Estos resultados concuerdan con los de una investigación previa llevada a cabo en nuestro país (García de Viedma *et al.*, 2005b); los autores de ese estudio determinaron que, salvo el SIT106, estos también eran los genotipos más prevalentes en Madrid. A su vez, como en ese otro trabajo, hemos observado que, en conjunto, la familia LAM (Sola *et al.*, 2001a), con todas sus variantes (SIT42/LAM9, SIT33/LAM3, SIT2652/LAM9, SIT20/LAM1, SIT209/LAM12-Mad1, SIT17/LAM2, SIT93/LAM5, SIT2331/LAM9, SIT770/LAM9, SIT1176/LAM9, SIT130/LAM3, SIT2302/LAM3, SIT578/LAM1, SIT866/LAM9, SIT60/LAM4, SIT1541/LAM9, SIT1830/LAM3, SIT162/LAM9, SIT828/LAM4, SIT388/LAM9, SIT509/LAM9, SIT64/LAM6 y SIT1354/LAM3), también fue la más abundante en Extremadura. Asimismo, nuestros resultados coinciden con los de un estudio realizado en Portugal (David *et al.*, 2007), donde la familia predominante fue la LAM, seguida de la T y la H; si bien, la proporción de aislados de la familia LAM en el país vecino (51 %) fue superior a la que nosotros encontramos (29.13 %). Por otro lado, al comparar

nuestros resultados con los datos recogidos en SITVITWEB de aislados europeos, se observa que la estructura de la población determinada en nuestro estudio es característica de un país del sur de Europa, y comparte los genotipos más prevalentes también en países como Austria y República Checa, cuya historia está estrechamente relacionada con el antiguo Imperio español (García de Viedma *et al.*, 2005b). Esta estructura poblacional de *M. tuberculosis* también se observa en países de Iberoamérica y del norte de África, algo lógico si tenemos en cuenta la proximidad con el continente africano y los vínculos históricos con ambas zonas geográficas.

La diversidad genética de *M. tuberculosis* parece estar estructurada geográficamente (Gagneux *et al.*, 2006; Hershberg *et al.*, 2008), ya que algunas cepas infectan preferentemente a ciertas poblaciones humanas, y las asociaciones entre los agentes patógenos y sus hospedadores parecen ser estables (Hirsh *et al.*, 2004). El linaje Euro-americano, por ejemplo, ha sido identificado en varias regiones de todo el mundo, aunque es predominante en Europa y América (Gagneux y Small, 2007). Este es el linaje más heterogéneo del MTBC y está integrado por 10 sublinajes distintos, cada uno de los cuales está definido por una delección (RD) específica (Gagneux *et al.*, 2006). Según la clasificación basada en el espoligotipado, el linaje Euro-americano se corresponde con cinco grandes familias (LAM, H, T, S y X), que se suelen caracterizar por la ausencia de los espaciadores 33-36 (Streicher *et al.*, 2007). Esta correspondencia se confirmó recientemente en un estudio sobre concordancia entre el análisis del LSP y el espoligotipado (Kato-Maeda *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta lo anterior, y basándonos en los resultados obtenidos con la aplicación TB-Lineage (Shabbeer *et al.*, 2012a), parece totalmente razonable que, en una región como la nuestra, el 97.94 % de los aislados se hayan clasificado como pertenecientes al linaje Euro-americano.

Por otra parte, de igual forma que se ha hecho con anterioridad en nuestro país (García de Viedma *et al.*, 2005b), planteamos la posibilidad de que exista una relación *filogeográfica* entre algunos genotipos encontrados en este estudio y España. No obstante, las limitaciones de nuestro trabajo y de la técnica empleada, especialmente para establecer relaciones evolutivas (Warren *et al.*, 2002; Comas *et al.*, 2009; Rindi *et al.*, 2012), nos hacen ser cautos a la hora de plantear estas asociaciones. Así pues, el SIT2652 es probablemente el genotipo más representativo de dicha relación, al haberse identificado 13 aislados con ese espoligotipo, mientras que en SITVITWEB tan solo hay registrados dos aislados, uno de Portugal y otro de Paraguay, países geográfica o históricamente relacionados con España. Un escenario hipotético de la evolución de este genotipo sugiere que el SIT42, que pertenece a la subfamilia LAM9, podría ser el origen del SIT2652, clasificado también como integrante de la subfamilia LAM9, por la pérdida de los espaciadores 26 y 27. Esta hipótesis se basa en varios estudios con cepas de *M. tuberculosis* en los que se determinó que la evolución del *locus* DR se produce principalmente por la pérdida de uno o varios espaciadores contiguos (Groenen *et al.*, 1993; Fang *et al.*, 1998; van Embden *et al.*, 2000). Otro genotipo que parece estar relacionado con nuestro ámbito geográfico es el NSIT13 (777777556360771), que pudo originarse a partir del SIT58 por la pérdida de los espaciadores 27 y 28. El SIT58 es uno de los genotipos más prevalentes tanto en nuestro estudio como en España, y pertenece a la subfamilia T5-Madrid2, que es específica de nuestro país y de zonas relacionadas con él (García de Viedma *et al.*, 2005b). Por último, otro genotipo que puede estar asociado también a nuestro territorio es el NSIT05 (777777777660400), ya que, igual que el anterior, ha sido identificado en cuatro aislados, y no existen registros con este perfil en SITVITWEB. La pérdida de los últimos seis espaciadores en el SIT167 ha podido ser el origen del NSIT05.

Se podría argumentar que nuestro estudio solo analiza los aislados obtenidos en una zona geográfica muy limitada y que para asociar estos genotipos a España se debe demostrar que están presentes también en otras regiones españolas. Sin embargo, el hecho de que España no aparezca como país de aislamiento de un determinado espoligotipo en SITVITWEB, no significa que esas cepas no existan en nuestro país. Así por ejemplo, los genotipos SIT3 (000000007720771), SIT36 (777737777720771), SIT37 (777737777760771), SIT46 (777777770000000), SIT450 (777776770000000) y SIT578 (637777607760771), también se han encontrado en otra investigación con aislados clínicos de *M. tuberculosis* (resistentes a la estreptomycin) en Barcelona (Tudó *et al.*, 2010). Por consiguiente, los 12 aislados con SIT37 encontrados en Extremadura no son los únicos aislamientos en los que se ha identificado este espoligotipo en nuestro país. A su vez, los genotipos SIT3, SIT36, SIT46, SIT450 y SIT578, se pueden considerar cepas únicas en nuestro estudio, incluso en Extremadura, pero no serían las únicas cepas aisladas en España con esos espoligotipos. Seguramente, cuando la base de datos SITVIT2 esté disponible públicamente y se puedan comparar nuevamente nuestros resultados con los datos actualizados, a algunos de los 19 espoligotipos denominados NSIT en este trabajo ya se les habrá asignado un número SIT. Asimismo es probable que para entonces haya más información sobre nuestro país, puesto que SITVIT2 contiene datos referentes a 111635 aislados clínicos del MTBC, casi el doble que SITVITWEB (Rastogi y Couvin, 2014). A esto también contribuirá nuestro estudio, puesto que, por ejemplo, cuando los resultados aquí presentados pasen a formar parte de esa base de datos, los aislados con espoligotipos «ORPHAN», en especial: «ORPHAN02» (776137400000171), «ORPHAN03» (777777777520731) y «ORPHAN05» (417176777760731), dejarán de ser «huérfanos».

Extremadura es una región en la que el fenómeno de la inmigración es relativamente reciente; por tanto, aunque el número de inmigrantes no es elevado en comparación con otras comunidades autónomas, el presente trabajo también puede contribuir a la comprensión de su influencia en la diversidad genotípica de *M. tuberculosis* en España. En este sentido, el país que más aislados foráneos ha aportado a este estudio fue Marruecos, donde también predomina el linaje Euro-americano (Lahlou *et al.*, 2012). Entre estos aislados se identificaron siete genotipos diferentes: SIT7, SIT42, SIT47, SIT751, SIT2652, SIT2331 y NSIT16 (777777742160771). El SIT42 es también el genotipo más prevalente en Marruecos (Lahlou *et al.*, 2012; Chaoui *et al.*, 2014). Exceptuando a dos espoligotipos, SIT2652 y NSIT16, del resto también tenemos conocimiento de su existencia en este país (Demay *et al.*, 2012; Chaoui *et al.*, 2014). En el caso del SIT2652, el único aislado de nuestro estudio con este genotipo identificado en un paciente no nacido en España, corresponde a una persona que llevaba más de 20 años viviendo en nuestro país; por lo que es poco probable que el SIT2652 sea un genotipo importado desde Marruecos. Por el contrario, el NSIT16, junto con el SIT751 y el SIT2331 (que sí se han identificado en Marruecos), son cepas únicas. Esto indica que seguramente esas personas ya estuvieran infectadas, antes de llegar a Extremadura, por cepas que no han sido transmitidas a la población autóctona. Lo mismo ocurre con el SIT34 (Portugal), SIT78, SIT602 y SIT1229 (Rumanía), SIT890 (Honduras) y NSIT14 (Brasil). La escasa relevancia en nuestro estudio, y por consiguiente en nuestra región, de la familia Beijing, uno de los genotipos más predominantes en la actualidad en todo el mundo (Parwati *et al.*, 2010), quedó demostrada al identificarse tan solo tres aislados con el SIT1 (todos resistentes a la estreptomomicina); además, ninguno pertenecía a pacientes españoles, sino que se aislaron en inmigrantes que procedían de países donde es frecuente aislar cepas del genotipo Beijing como son China (Wan *et al.*, 2011)

y Perú (Iwamoto *et al.*, 2012). Esta situación ya ha sido descrita previamente en nuestro país (Samper *et al.*, 2005; Alonso *et al.*, 2010), y nuestros resultados coinciden con los de otros estudios que informaron de la introducción del genotipo Beijing en España a través de pacientes suramericanos (Codina *et al.*, 1999; García de Viedma *et al.*, 2006a). Por último, analizando nuestros resultados, consideramos que, en los últimos años, el único genotipo que ha podido llegar por primera vez a la zona de estudio con un paciente extranjero y ser transmitido a la población autóctona es el SIT106, ya que la fecha del primer aislamiento de este genotipo fue noviembre de 1998 y la muestra pertenecía a un inmigrante cuyo país de origen era Brasil. Sin embargo, solo con estos datos es imposible confirmar que este sea realmente un genotipo importado, sobre todo teniendo en cuenta que también se había encontrado en otra zona de España (Sola *et al.*, 2001b). Estos resultados parecen descartar que exista una importante transmisión de TB de esta población inmigrante a la población autóctona, o viceversa, y coinciden con lo descrito por otros autores (Chin *et al.*, 1998; Diel *et al.*, 2002; Geng *et al.*, 2002; Barniol *et al.*, 2009). No obstante, nuestros datos contrastan con los de otros trabajos españoles (Iñigo *et al.*, 2007; Martínez-Lirola *et al.*, 2008; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2009a; Borrell *et al.*, 2010; Gil *et al.*, 2011), en los que se encontró una alta proporción de casos en extranjeros y se observó que existía una transmisión bidireccional entre la población autóctona y la inmigrante; si bien, estos estudios se llevaron a cabo en zonas con mayor población extranjera, como Madrid, Barcelona, Castellón o Almería (Fuente: Instituto Nacional de Estadística).

En conclusión, la influencia de la inmigración en la diversidad genotípica de *M. tuberculosis* en Extremadura parece ser escasa. Además, la incidencia de la familia Beijing es muy baja y no hay evidencia de transmisión o mayor virulencia. Por tanto, este trabajo confirma que en nuestra región, por el momento, no es necesario adoptar

medidas específicas para controlar la enfermedad en la población inmigrante. Aun así, los resultados observados con el espoligotipado muestran una elevada diversidad genética entre las cepas de *M. tuberculosis* que causan la TB humana en Extremadura, con un claro predominio de las familias que se corresponden con el linaje Euroamericano. No obstante, la poca información disponible en nuestro país y las limitaciones del método utilizado, nos impide aclarar ciertos aspectos aquí planteados; en especial, la posibilidad de que exista una asociación *filogeográfica* entre algunos genotipos identificados en este trabajo, como el SIT2652, NSIT05 o NSIT13, y nuestro ámbito geográfico.

11. Utilidad del MLVA para el genotipado de *Mycobacterium tuberculosis* en Extremadura

RESUMEN

En este experimento hemos utilizado el MLVA para determinar el genotipo de una colección de aislados de *M. tuberculosis* que previamente había sido caracterizada mediante el espiligotipado. El objetivo fue obtener más conocimientos acerca de la aplicabilidad de estrategias de genotipado con marcadores VNTR en un entorno de baja incidencia de TB como es Extremadura. El MLVA se llevó a cabo mediante la amplificación por PCR de un conjunto de 15 *loci* (424, 577, 580, 802, 960, 1644, 1955, 2163b, 2165, 2401, 2996, 3192, 3690, 4052 y 4156). Los productos amplificados se separaron por electroforesis capilar. Se identificaron 190 perfiles MLVA diferentes en los 403 aislados incluidos en el análisis; de los cuales, 60 fueron perfiles compartidos y 130 perfiles únicos. En general, la diversidad alélica observada en nuestro estudio fue bastante alta. Los *loci* 4052, 2163b y 802 fueron los más discriminatorios, mientras que los *loci* que mostraron una menor variabilidad fueron el 580 y el 3192. El poder de discriminación y la tasa de agrupamiento del conjunto de 15 *loci* VNTR (HGDI = 0.9886; 67.74 %) fueron similares a los valores mostrados por una combinación de 12 *loci* (HGDI = 0.9878; 68.49 %). Por ello, se propone el uso del MLVA con un conjunto reducido de 12 *loci* VNTR como técnica de primera línea para el genotipado de aislados clínicos de *M. tuberculosis* en Extremadura.

ABSTRACT

In this study, we have used a MLVA assay for genotyping a collection of *M. tuberculosis* isolates previously characterized by spoligotyping. The objective was to gain knowledge about the suitability of VNTR markers for typing purposes in an

environment of low incidence of TB like Extremadura. The MLVA assay was performed by PCR amplification of a set of 15 loci (424, 577, 580,802, 960, 1644, 1955, 2163b, 2165, 2401, 2996, 3192, 3690, 4052 and 4156). Amplified products were separated by capillary electrophoresis. Among 403 analyzed isolates of *M. tuberculosis*, 190 MLVA distinct profiles were identified, being 130 of them unique. In general, the allelic diversity observed was quite high. 4052, 2163b and 802 loci were the most discriminant meanwhile 580 and 3192 loci showed less variability. The discriminatory power and the clustering rate of all 15 VNTR loci (HGDI = 0.9886; 52.85 %) were similar compared to the results obtained with a selected set of 12 loci (HGDI = 0.9878; 53.84 %). Thus, the use of MLVA assay with a reduced set of 12 VNTR loci is proposed as a suitable first-line genotyping technique for clinical isolates of *M. tuberculosis* in Extremadura.

INTRODUCCIÓN

El genotipado de aislados clínicos de *M. tuberculosis* ha permitido ampliar nuestros conocimientos sobre la TB. Lamentablemente, en los hospitales españoles no está muy generalizado el uso de técnicas de genotipado que permitan algo más que la simple determinación de la especie implicada en el proceso. Entre esas técnicas, posiblemente la más utilizada en la actualidad en todo el mundo sea el MLVA, debido a su sencillez, rapidez, fiabilidad y reproducibilidad (Lindstedt, 2005). Numerosos estudios han demostrado que este método proporciona una buena discriminación entre las cepas del MTBC y también ayuda a establecer relaciones filogenéticas (Mazars *et al.*, 2001; Supply *et al.*, 2001; Cowan *et al.*, 2002; Sola *et al.*, 2003; Oelemann *et al.*, 2007; Allix-Béguec *et al.*, 2008a; Hill *et al.*, 2012; Rindi *et al.*, 2014). En nuestro caso, hemos utilizado un conjunto de 15 *loci* VNTR propuesto por Supply *et al.* (2006) para

determinar el genotipo de una colección de aislados de *M. tuberculosis* que previamente habían sido caracterizados mediante el espoligotipado (Apartado 10). La eficacia de esta combinación de 15 *loci* VNTR se evaluó en un trabajo realizado en España (Alonso-Rodríguez *et al.*, 2008), demostrándose la utilidad de este sistema para el genotipado de *M. tuberculosis* en nuestro entorno. A pesar de ello, es notoria la escasez de publicaciones con trabajos españoles en los que se haya empleado este método para tipificar aislados clínicos de *M. tuberculosis* (Alonso-Rodríguez *et al.*, 2009b; Alonso *et al.*, 2010), y algunos se centran exclusivamente en el estudio de cepas resistentes (López-Calleja *et al.*, 2009; Gavín *et al.*, 2012). El objetivo del presente trabajo fue obtener más conocimientos acerca de la aplicabilidad de estrategias de genotipado con marcadores VNTR en un entorno de baja prevalencia de TB como es Extremadura; y con ello, aportar más información sobre la utilidad del MLVA para el estudio de esta enfermedad en España.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados clínicos y muestras de ADN

Se han analizado los aislados clínicos de *M. tuberculosis* de origen humano que ya habían sido genotipados mediante el espoligotipado; por tanto, el cultivo bacteriológico, la identificación y la extracción de ADN se realizaron como se ha descrito anteriormente (Apartado 10). En total, se caracterizaron 441 muestras de ADN de *M. tuberculosis*, incluyendo los cinco aislados que estaban duplicados (dos muestras de un mismo caso) con el objetivo de comprobar la reproducibilidad de la técnica en nuestro laboratorio.

PCR para el MLVA

El MLVA se llevó a cabo mediante la amplificación por PCR de un conjunto de 15 *loci* VNTR propuesto por Supply *et al.* (2006) por su capacidad discriminatoria entre cepas, empleando oligonucleótidos complementarios a las regiones flanqueantes de esos *loci* (tabla 8). Uno de los cebadores de cada pareja utilizada para la amplificación de los VNTR se marcó con alguno de estos cuatro fluorocromos: 6-FAM, PET, NED o VIC. En lugar de realizar PCR múltiples, cada *locus* VNTR se amplificó de manera individual, usando el kit «HotStarTaq DNA Polymerase» (QIAGEN®, Hilden, Alemania), en un volumen final de reacción de 20 µl. La composición de la mezcla de reacción fue la siguiente: de 2 a 10 ng de ADN; 0.1 µl de ADN polimerasa (0.5 U); 4 µl de «Q-Solution»; 2 µl de «PCR Buffer»; de 1.5 a 3.5 mM de MgCl₂ (tabla 8); 0.2 mM de cada dNTP («dNTP Mix», Promega Biotech Ibérica, Alcobendas, España); 0.4 µM de cada cebador (Applied Biosystems®, Warrington, Inglaterra); y agua ultrapura estéril, para ajustar el volumen final. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador «PCR Express» (Hybaid, Ashford, Inglaterra) con las condiciones descritas por Supply *et al.* (2000), excepto para el *locus* 4156, que se bajó la temperatura de hibridación a 50 °C. Los productos amplificados se diluyeron con agua destilada (1:10) y posteriormente se mezclaron en la misma proporción, conformando los denominados «Mix de carrera» (tabla 8).

Análisis de los productos amplificados

En placas de 96 pocillos, se mezcló 1 µl de la muestra con 9 µl de formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems®, Warrington, Inglaterra) y 0.5 µl del marcador de pesos moleculares GeneScan™ 1200 LIZ® (Applied Biosystems®, Warrington, Inglaterra). A continuación, las muestras se desnaturalizaron, en un termociclador «GeneAmp® PCR

System 2700» (Applied Biosystems[®], Foster City, EE. UU.), a 95 °C durante 5 minutos y luego se mantuvieron en hielo durante otros 5 minutos aproximadamente. Los fragmentos de ADN se separaron por electroforesis capilar en el secuenciador «3130 Genetic Analyzer» (Applied Biosystems[®], Foster City, EE. UU.), utilizando polímero POP-7[™] y capilares de 36 cm. Las condiciones para la electroforesis capilar fueron las siguientes: temperatura de funcionamiento, 60 °C; voltaje previo a la carrera, 15 kV; tiempo previo a la carrera, 180 s; voltaje de inyección de la muestra, 1 kV; tiempo de inyección de la muestra, 16 s; voltaje durante la carrera, 12 kV; y tiempo de carrera, 2700 s. La determinación del tamaño de los amplicones y la asignación de los diferentes alelos se realizó con el *software* GeneMapper[®] 3.7 (Applied Biosystems[®]), siguiendo las recomendaciones de otros autores (Allix *et al.*, 2004; Supply, 2005). Para determinar el número de repeticiones en cada *locus* VNTR se utilizó como control ADN purificado de *M. tuberculosis* H37Rv, proporcionado amablemente por D. García de Viedma (Hospital Gregorio Marañón, Madrid, España); y la asignación se realizó de acuerdo con la correspondencia entre el tamaño del amplicón y el número de copias en H37Rv descrita en otros trabajos (Goyal *et al.*, 1994; Frothingham y Meeker-O'Connell, 1998; Supply *et al.*, 2000; Le Flèche *et al.*, 2002; Skuce *et al.*, 2002). El perfil MLVA se definió a partir del número de repeticiones en cada uno de los 15 *loci* VNTR amplificados, según el siguiente orden: 424, 577, 580, 802, 960, 1644, 1955, 2163b, 2165, 2401, 2996, 3192, 3690, 4052 y 4156.

Utilización de MIRU-VNTRplus

Para analizar los datos del genotipado se utilizó MIRU-VNTRplus (Allix-Béguec *et al.*, 2008b; Weniger *et al.*, 2010), una aplicación web de libre acceso (www.miru-vntrplus.org) que, entre otras utilidades, permite la identificación del linaje

filogenético a partir de una base de datos compuesta por una colección de 186 cepas de referencia del MTBC («Identification by Similarity Search»). Con otra de las herramientas de MIRU-VNTR*plus* («Calculate Minimum Spanning Tree»), elaboramos un MST para estudiar la relación genética existente entre los diferentes perfiles MLVA identificados en el presente trabajo. Finalmente, con otra aplicación («Calculate phyogenetic tree»), fabricamos un dendrograma, utilizando el coeficiente categórico como medida de distancia genética y el UPGMA como algoritmo de agrupación, con el que pudimos establecer las similitudes entre los diferentes perfiles MLVA.

Análisis de grupos, diversidad alélica y poder de discriminación

El análisis de grupos se realizó con la ayuda de dendrogramas (generados como se ha descrito justo antes) que nos permitieron visualizar las relaciones entre los diferentes aislados de *M. tuberculosis*. Cada grupo se formó con aquellos aislados que presentaban perfiles idénticos, y la tasa de agrupamiento se calculó con la fórmula: n_c / n ; donde n_c es el número de aislados agrupados y n el número total de aislados en la muestra (Alland *et al.*, 1994).

La diversidad alélica (h), o índice de discriminación de Hunter-Gaston (*Hunter-Gaston discriminatory index*, HGDI), de cada uno de los *loci* VNTR se calculó con la ecuación de Hunter y Gaston (1988), fórmula idéntica a la del índice de diversidad de Simpson (Simpson, 1949):

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

donde D es el índice de discriminación, N el número de aislados, S el número total de alelos y n_j el número de aislados con el alelo j (Hunter y Gaston, 1988). Para este cálculo se utilizó una aplicación («Discriminatory Power Calculator») disponible en

línea: http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/. De igual forma, se determinó el poder de discriminación del conjunto de 15 *loci* VNTR, así como de las distintas combinaciones de estos *loci*.

«Mix de carrera»	Locus	Alias	Tamaño de repetición en pb	[MgCl ₂] (mM)	Pares de cebadores (5'a 3'), con el fluorocromo indicado entre paréntesis
Mix1	424	Mtub04	51	1.5	CTTGCCGGGCATCAAGCGCATTATT (VIC) GGCAGCAGAGCCCCGGGATTCTTC
	577	ETR-C	58	2	CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT (PET) AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA
	4052	QUB-26	111	2	AACGCTCAGCTGTCGGAT (NED) CGGCCGTGCCGGCCAGGTCCTTCCCGAT
	2163b	QUB-11b	69	2	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG (FAM) CGAAGTGAATGGTGGCAT
Mix2	3192	MIRU 31	53	2	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA (VIC) GTGCCGACGTGGTCTTGAT
	1955	Mtub21	57	2	AGATCCCAGTTGTCGTCGTC (PET) CAACATCGCCTGGTCTGTGA
	2165	ETR-A	75	2	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT (NED) CGAAGCCTGGGGTGCCCCGCGATT
	960	MIRU10	53	2	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC (FAM) GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT
Mix3	1644	MIRU16	53	3	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA (VIC) CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC
	2996	MIRU26	51	3	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC (PET) CATAGGCGACCAGGCGAATAG
	802	MIRU40	54	3	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT (NED) GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA
	2401	Mtub30	58	3	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT (FAM) ACTTGAACCCCCACGCCATTAGTA
Mix4	3690	Mtub39	58	3	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC (PET) TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG
	580	MIRU4	77	3	GCGCGAGAGCCCGAACTGC (FAM) GCGCAGCAGAAACGCCAGC
	4156	QUB-4156	59	3.5	TGACCACGGATTGCTCTAGT (NED) GCCGGCGTCCATGTT

Tabla 8: Loci VNTR y secuencias de los cebadores utilizados en este estudio. Cada «Mix de carrera» indica los VNTR que se mezclaron para la misma electroforesis y el marcaje de cada uno de ellos. Los *loci* se identificaron con números que se corresponden con su posición (en kpb) en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv.

RESULTADOS

Reproducibilidad del MLVA

Con el fin de comprobar la reproducibilidad del MLVA en nuestro laboratorio, se analizaron «a ciegas» y por separado cinco aislados de *M. tuberculosis* duplicados. Los resultados fueron idénticos en todas las muestras procedentes de un mismo caso, lo cual indica que la reproducibilidad del MLVA bajo nuestras condiciones fue del 100 %.

Genotipos y perfiles MLVA

En total, se analizaron 441 muestras de ADN de *M. tuberculosis*, aunque 38 de ellas se excluyeron del análisis de datos por varias razones. La ausencia de producto amplificado impidió que en algunas muestras se pudiera determinar el número de repeticiones en uno o más *loci* VNTR, resultando imposible definir el perfil MLVA completo; por esta razón se excluyeron 25 (5.68 %) aislados. Los dos *loci* VNTR en los que se observaron mayores problemas de amplificación fueron el 4052 y 4156; en ambos casos, se utilizó el fluorocromo NED para marcar a los cebadores. Tampoco se incluyó en el análisis a las ocho (1.81 %) muestras en las que se identificaron dos alelos en uno o más *loci* VNTR, lo cual indica la posible presencia de dos cepas distintas en un mismo paciente (Cohen *et al.*, 2012). Finalmente, de los aislados duplicados, solo se incluyó una muestra de cada caso. Entre los 403 (91.59 %) aislados restantes, se identificaron 190 perfiles MLVA diferentes (tabla 9); de los cuales, 130 eran perfiles únicos, mientras que los otros 60 fueron perfiles compartidos. Al comparar nuestros resultados con la base de datos MIRU-VNTR*plus*, se comprobó que no existían coincidencias; por tanto, no se pudo asignar a ninguno de nuestros perfiles MLVA el código MtbC15 utilizado en la nomenclatura de MIRU-VNTR*plus* (Weniger *et al.*, 2010). Los perfiles con mayor número de aislados fueron: M15Ex069 (n = 24), M15Ex108 (n = 14), M15Ex187 (n = 13) y M15Ex104 (n = 12).

Perfil MLVA	Nº de repeticiones por locus VNTR															Nº de asilados (%)
	424	577	580	802	960	1644	1955	2163b	2165	2401	2996	3192	3690	4052	4156	
M15Ex001	2	4	3	8	3	3	2	3	2	2	5	3	6	4	2	1 (0.25)
M15Ex002	2	4	3	6	3	3	2	3	2	2	5	3	6	7	2	1 (0.25)
M15Ex003	3	4	3	2	3	3	2	5	2	2	5	3	6	5	2	1 (0.25)
M15Ex004	2	4	3	2	3	3	2	4	2	2	5	3	6	5	2	3 (0.74)
M15Ex005	2	4	3	2	3	3	2	2	2	2	5	3	6	5	2	1 (0.25)
M15Ex006	2	4	3	3	3	3	2	2	2	2	5	3	6	5	2	7 (1.74)
M15Ex007	2	4	3	4	3	3	2	2	2	2	5	3	6	5	2	1 (0.25)
M15Ex008	2	4	3	4	3	2	2	2	2	2	5	3	6	5	2	1 (0.25)
M15Ex009	2	4	3	2	1	3	2	5	2	2	5	3	6	4	2	1 (0.25)
M15Ex010	1	4	3	2	3	3	2	1	2	2	5	3	6	4	2	1 (0.25)
M15Ex011	2	4	3	2	3	4	2	3	2	2	5	3	6	3	2	1 (0.25)
M15Ex012	2	4	3	2	3	3	2	3	2	2	5	3	6	3	2	1 (0.25)
M15Ex013	2	4	3	2	3	4	2	3	2	2	5	3	5	5	2	2 (0.50)
M15Ex014	2	4	3	2	3	4	2	3	2	2	5	3	6	5	2	1 (0.25)
M15Ex015	2	4	3	2	3	4	2	3	2	2	6	3	6	5	2	2 (0.50)
M15Ex016	2	4	3	2	3	4	2	3	2	2	6	4	6	5	2	1 (0.25)
M15Ex017	2	4	3	2	3	4	2	3	2	2	7	3	6	6	2	1 (0.25)
M15Ex018	2	3	3	1	3	4	2	1	2	2	5	3	6	5	2	1 (0.25)
M15Ex019	2	3	3	2	3	4	2	4	2	2	5	3	6	5	2	7 (1.74)
M15Ex020	2	3	3	2	3	4	2	3	2	2	5	3	6	5	2	1 (0.25)
M15Ex021	2	4	3	2	3	4	2	4	2	2	5	3	6	5	2	11 (2.73)
M15Ex022	2	4	3	2	3	4	2	4	2	2	5	3	4	5	2	2 (0.50)
M15Ex023	2	4	3	2	2	4	2	4	2	2	5	3	6	5	2	4 (0.99)
M15Ex024	2	4	3	1	3	4	2	4	2	2	5	3	6	5	2	2 (0.50)
M15Ex025	2	4	3	2	3	4	2	4	2	2	4	3	6	4	2	1 (0.25)
M15Ex026	2	4	3	2	3	4	2	4	2	2	4	3	6	5	2	2 (0.50)
M15Ex027	2	3	3	2	3	4	2	3	2	2	6	3	6	4	2	1 (0.25)
M15Ex028	2	4	3	4	3	1	2	3	3	2	5	3	8	5	2	2 (0.50)
M15Ex029	2	4	3	5	3	1	2	3	3	2	5	3	8	5	2	1 (0.25)
M15Ex030	2	2	3	4	3	1	2	3	3	2	3	3	10	5	2	1 (0.25)
M15Ex031	2	4	3	3	3	3	2	3	3	2	5	3	6	5	2	4 (0.99)
M15Ex032	2	4	3	4	3	3	2	3	3	2	5	3	6	5	2	8 (1.99)
M15Ex033	2	4	3	2	3	3	2	3	3	2	5	3	6	5	2	1 (0.25)
M15Ex034	2	4	3	4	3	3	2	3	3	2	5	3	5	5	2	1 (0.25)
M15Ex035	2	4	3	3	3	3	2	3	3	2	5	3	6	3	2	2 (0.50)
M15Ex036	2	4	3	5	3	3	2	3	3	2	8	3	6	5	2	1 (0.25)
M15Ex037	2	4	3	5	3	3	2	2	3	2	5	3	5	5	2	1 (0.25)
M15Ex038	2	4	3	5	3	3	2	2	3	2	5	3	6	5	2	1 (0.25)
M15Ex039	2	4	3	2	3	3	2	2	3	2	5	3	6	5	2	1 (0.25)
M15Ex040	2	4	3	3	3	3	2	2	3	2	5	3	6	5	2	1 (0.25)
M15Ex041	2	4	3	5	3	3	2	4	3	2	5	3	6	3	2	1 (0.25)
M15Ex042	2	4	3	4	3	3	2	3	3	2	4	3	6	5	2	1 (0.25)
M15Ex043	2	4	3	4	3	3	2	3	3	2	4	3	6	5	3	1 (0.25)
M15Ex044	2	4	3	4	3	3	2	4	3	2	4	3	6	5	2	1 (0.25)
M15Ex045	1	4	3	4	3	3	2	3	3	2	3	3	6	5	2	4 (0.99)
M15Ex046	2	4	3	2	3	3	2	3	3	2	2	3	5	5	2	1 (0.25)
M15Ex047	2	4	3	1	3	3	2	5	3	2	5	3	4	5	2	1 (0.25)
M15Ex048	2	4	4	4	3	3	2	5	3	2	5	3	6	2	2	1 (0.25)
M15Ex049	1	4	3	5	3	2	2	5	3	2	5	3	6	5	2	2 (0.50)
M15Ex050	2	4	3	1	3	3	2	4	3	2	4	3	8	3	2	1 (0.25)
M15Ex051	1	2	3	4	3	3	2	2	2	2	5	3	6	6	2	1 (0.25)
M15Ex052	2	4	3	3	3	3	3	4	4	2	5	3	5	5	2	1 (0.25)
M15Ex053	3	4	3	3	2	3	2	5	3	2	5	3	5	5	2	1 (0.25)
M15Ex054	2	3	2	2	3	2	2	4	2	2	4	3	6	5	2	1 (0.25)
M15Ex055	2	4	3	1	3	3	3	3	2	1	4	3	5	6	2	1 (0.25)
M15Ex056	2	4	3	1	3	3	2	3	2	2	5	4	5	4	2	1 (0.25)
M15Ex057	2	4	3	4	4	3	2	3	2	2	6	3	8	5	2	4 (0.99)
M15Ex058	4	4	3	2	4	3	2	3	2	2	7	4	8	5	2	1 (0.25)
M15Ex059	4	4	3	2	4	3	2	3	2	1	8	4	8	5	2	1 (0.25)
M15Ex060	1	5	3	2	3	3	3	3	3	2	4	3	7	3	2	1 (0.25)
M15Ex061	3	4	4	2	3	3	1	5	4	2	5	2	6	6	2	1 (0.25)
M15Ex062	4	4	4	2	3	3	1	4	3	2	5	2	6	9	2	2 (0.50)
M15Ex063	2	3	3	2	2	3	1	2	3	2	5	2	6	5	2	1 (0.25)
M15Ex064	2	4	3	4	3	3	1	3	3	2	5	2	7	1	2	1 (0.25)
M15Ex065	3	5	4	5	2	3	1	3	3	2	5	3	6	10	2	1 (0.25)

Tabla 9: Resultados del MLVA para los 403 aislados.

Continúa en la siguiente página

Perfil MLVA	Nº de repeticiones por locus VNTR														Nº de aislados (%)	
	424	577	580	802	960	1644	1955	2163b	2165	2401	2996	3192	3690	4052		4156
M15Ex066	2	4	4	3	3	3	1	4	5	2	4	3	6	1	2	1 (0.25)
M15Ex067	1	4	4	6	3	3	1	4	4	2	5	3	6	4	1	1 (0.25)
M15Ex068	1	4	7	6	3	4	1	3	4	2	5	3	6	8	2	1 (0.25)
M15Ex069	4	4	3	3	4	3	2	4	2	2	3	3	4	7	2	24 (5.96)
M15Ex070	2	4	3	3	4	3	2	4	2	2	3	3	4	7	2	8 (1.99)
M15Ex071	4	4	3	3	4	3	2	4	2	2	3	3	4	5	2	1 (0.25)
M15Ex072	3	4	3	3	4	3	2	4	2	2	3	3	4	3	2	1 (0.25)
M15Ex073	3	5	3	4	4	3	2	4	2	2	3	3	4	7	2	1 (0.25)
M15Ex074	4	4	3	1	4	3	2	4	2	2	5	3	4	3	2	1 (0.25)
M15Ex075	4	4	3	3	4	3	3	2	2	2	4	3	4	4	2	2 (0.50)
M15Ex076	4	4	3	3	4	3	3	4	2	2	4	3	4	4	2	1 (0.25)
M15Ex077	4	2	3	3	4	3	3	4	2	2	4	3	4	4	2	1 (0.25)
M15Ex078	4	4	3	3	4	3	2	4	2	2	4	3	4	4	2	1 (0.25)
M15Ex079	6	4	3	3	4	3	3	4	2	2	5	3	4	6	2	2 (0.50)
M15Ex080	4	4	3	3	4	3	3	4	2	2	5	3	4	6	2	1 (0.25)
M15Ex081	3	4	3	4	5	3	3	4	2	2	5	3	4	4	2	1 (0.25)
M15Ex082	4	4	3	4	4	3	2	3	2	2	3	2	4	2	2	7 (1.74)
M15Ex083	4	3	3	5	4	3	2	3	2	2	5	3	4	6	2	1 (0.25)
M15Ex084	1	4	3	3	4	3	3	3	2	2	1	3	4	6	3	1 (0.25)
M15Ex085	5	4	3	3	4	3	3	3	1	2	4	3	4	3	2	1 (0.25)
M15Ex086	5	2	3	3	4	2	3	4	2	2	5	3	4	8	2	1 (0.25)
M15Ex087	5	2	3	4	4	2	3	4	2	2	5	3	4	7	2	1 (0.25)
M15Ex088	5	2	3	3	4	2	3	5	2	2	5	3	4	7	2	1 (0.25)
M15Ex089	3	2	3	3	4	2	3	3	2	2	5	3	4	7	2	7 (1.74)
M15Ex090	3	2	3	3	4	2	2	4	2	2	5	3	4	7	2	1 (0.25)
M15Ex091	4	2	3	3	4	2	3	4	2	2	3	3	4	7	2	1 (0.25)
M15Ex092	4	2	3	3	4	2	3	4	2	2	5	3	4	7	2	1 (0.25)
M15Ex093	4	2	3	3	4	2	3	4	2	2	6	3	4	7	2	1 (0.25)
M15Ex094	4	2	3	3	4	2	3	2	2	2	7	3	4	7	2	1 (0.25)
M15Ex095	4	2	3	3	5	2	3	3	2	2	5	3	4	6	2	1 (0.25)
M15Ex096	4	2	3	3	4	2	3	3	2	2	5	3	4	6	2	1 (0.25)
M15Ex097	4	2	3	3	4	2	3	3	2	2	5	3	4	4	2	1 (0.25)
M15Ex098	4	2	3	4	5	2	3	3	2	2	5	3	4	7	2	1 (0.25)
M15Ex099	1	4	3	1	3	2	3	2	2	1	5	3	5	4	2	5 (1.24)
M15Ex100	1	4	3	1	3	2	3	2	2	1	3	3	5	4	2	1 (0.25)
M15Ex101	1	4	3	1	4	2	3	2	2	1	6	3	6	5	2	2 (0.50)
M15Ex102	1	4	3	1	4	2	3	2	2	1	6	3	6	4	2	1 (0.25)
M15Ex103	5	4	3	1	4	2	3	2	1	1	6	3	5	6	2	1 (0.25)
M15Ex104	4	4	5	1	3	2	3	4	2	1	4	3	5	7.7	2	12 (2.98)
M15Ex105	4	4	5	1	2	2	3	4	2	1	4	3	5	8	2	1 (0.25)
M15Ex106	4	4	3	1	3	2	3	4	2	1	4	3	5	8	2	1 (0.25)
M15Ex107	4	4	3	1	3	2	3	4	2	1	5	3	5	8	2	3 (0.74)
M15Ex108	4	4	2	1	3	2	3	4	2	1	5	3	5	8	2	14 (3.47)
M15Ex109	4	4	2	1	3	2	3	3	2	1	5	3	5	8	2	4 (0.99)
M15Ex110	2	4	2	1	3	2	3	4	2	1	5	3	5	8	2	1 (0.25)
M15Ex111	4	4	3	1	4	2	3	1	2	1	5	3	5	8	2	1 (0.25)
M15Ex112	4	4	3	1	4	2	3	2	2	1	5	2	5	8	2	1 (0.25)
M15Ex113	4	4	3	1	4	2	3	3	2	1	5	2	5	9	2	1 (0.25)
M15Ex114	5	4	3	1	4	2	3	4	2	1	5	3	5	6	2	1 (0.25)
M15Ex115	5	4	3	1	4	2	3	3	2	1	5	3	5	8	2	1 (0.25)
M15Ex116	4	4	3	1	4	2	3	3	2	1	4	3	5	7	2	1 (0.25)
M15Ex117	2	4	3	1	4	2	3	3	2	1	5	3	5	7	2	1 (0.25)
M15Ex118	3	5	2	1	4	1	3	3	2	1	1	3	6	8	2	1 (0.25)
M15Ex119	4	5	3	1	4	1	2	3	2	1	3	3	5	8	2	1 (0.25)
M15Ex120	3	3	3	2	4	3	3	2	2	1	5	3	4	5	3	6 (1.49)
M15Ex121	4	4	3	2	4	3	2	2	2	1	5	3	5	7	3	2 (0.50)
M15Ex122	3	4	3	2	4	3	2	2	2	1	5	3	5	7	3	1 (0.25)
M15Ex123	3	4	3	5	3	2	3	2	2	1	4	3	5	9	3	1 (0.25)
M15Ex124	3	4	3	4	4	2	3	2	2	1	5	3	5	6	3	1 (0.25)
M15Ex125	3	4	3	4	3	3	5	3	2	1	5	3	5	9	3	6 (1.49)
M15Ex126	3	4	3	4	3	3	3	2	2	1	5	3	5	9	3	2 (0.50)
M15Ex127	3	4	3	4	2	3	3	2	2	1	5	3	5	9	3	1 (0.25)
M15Ex128	3	3	3	4	3	3	3	2	2	1	5	4	5	9	3	1 (0.25)
M15Ex129	3	4	3	4	5	3	3	2	2	1	5	2	5	7	2	1 (0.25)
M15Ex130	3	2	3	4	4	3	3	2	2	1	5	2	5	7	2	1 (0.25)

Tabla 9: Resultados del MLVA para los 403 aislados (continuación).

Continúa en la siguiente página

Perfil MLVA	Nº de repeticiones por locus VNTR															Nº de aislados (%)
	424	577	580	802	960	1644	1955	2163b	2165	2401	2996	3192	3690	4052	4156	
M15Ex131	3	2	3	2	4	3	4	2	2	1	5	2	5	7	2	1 (0.25)
M15Ex132	3	4	3	3	4	3	3	2	1	1	5	2	5	6	2	1 (0.25)
M15Ex133	3	4	3	6	4	3	3	2	1	1	5	2	5	6	2	1 (0.25)
M15Ex134	4	4	3	4	4	3	3	2	2	1	5	2	5	6	2	1 (0.25)
M15Ex135	3	4	3	4	4	3	4	1	2	1	4	2	5	6	2	1 (0.25)
M15Ex136	1	4	3	4	4	3	3	2	2	1	4	2	5	5	2	1 (0.25)
M15Ex137	4	3	3	3	5	2	4	3	2	4	5	3	7	8	3	1 (0.25)
M15Ex138	2	3	3	3	5	2	2	3	2	4	5	3	6	8	3	1 (0.25)
M15Ex139	2	3	3	3	5	3	3	4	3	4	5	3	6	7	3	5 (1.24)
M15Ex140	2	3	3	3	5	3	3	4	3	4	5	3	6	5	3	1 (0.25)
M15Ex141	2	3	3	3	5	3	3	4	3	4	5	3	6	6	3	1 (0.25)
M15Ex142	2	3	3	5	5	3	3	4	3	4	5	3	6	7	3	1 (0.25)
M15Ex143	2	3	3	3	5	3	3	5	3	4	5	3	6	4	3	2 (0.50)
M15Ex144	2	3	3	3	5	3	3	5	3	4	5	3	6	7	3	1 (0.25)
M15Ex145	2	3	3	4	5	3	3	4	3	4	5	3	6	4	3	2 (0.50)
M15Ex146	2	3	3	3	5	3	3	3	3	4	5	3	6	3	3	2 (0.50)
M15Ex147	2	3	3	3	5	3	3	3	3	4	5	3	6	5	3	5 (1.24)
M15Ex148	2	3	3	3	5	3	3	3	3	4	5	3	8	7	3	1 (0.25)
M15Ex149	2	3	3	3	5	3	3	6	3	4	5	2	6	6	3	5 (1.24)
M15Ex150	2	3	3	3	5	3	3	6	3	4	5	3	6	6	3	4 (0.99)
M15Ex151	2	3	3	3	6	3	3	6	3	4	5	3	6	6	3	3 (0.74)
M15Ex152	2	3	3	3	5	3	3	2	3	4	5	3	6	6	3	2 (0.50)
M15Ex153	2	3	3	3	5	3	3	4	3	4	5	3	5	6	3	4 (0.99)
M15Ex154	2	3	3	3	5	3	3	5	3	4	5	3	5	3	3	1 (0.25)
M15Ex155	1	3	3	1	5	3	3	5	3	4	5	3	6	6	3	1 (0.25)
M15Ex156	2	3	3	3	5	3	2	5	3	4	5	3	6	4	3	1 (0.25)
M15Ex157	2	3	3	3	5	3	2	5	3	4	5	3	6	6	3	4 (0.99)
M15Ex158	2	3	3	3	5	3	2	7	3	4	5	3	6	6	3	1 (0.25)
M15Ex159	2	3	3	3	2	3	2	4	3	4	5	3	6	6	3	1 (0.25)
M15Ex160	2	3	3	3	2	3	2	5	3	4	5	3	6	6	3	3 (0.74)
M15Ex161	3	3	3	3	5	3	2	4	3	4	5	3	6	6	3	4 (0.99)
M15Ex162	3	3	3	3	5	3	2	5	3	4	5	3	6	6	3	1 (0.25)
M15Ex163	3	3	3	3	5	3	2	6	3	4	5	3	6	4	3	9 (2.23)
M15Ex164	2	3	3	3	6	3	2	5	3	4	5	3	6	6	1	1 (0.25)
M15Ex165	2	3	3	3	6	3	2	6	3	4	5	3	6	3	3	2 (0.50)
M15Ex166	2	3	3	3	6	3	2	5	3	4	5	3	6	5	3	1 (0.25)
M15Ex167	2	3	3	3	6	3	2	4	3	4	5	3	6	5	3	1 (0.25)
M15Ex168	2	3	3	3	6	3	2	4	3	4	5	3	6	4	3	1 (0.25)
M15Ex169	2	3	3	3	6	3	2	6	3	4	6	3	6	6	3	1 (0.25)
M15Ex170	2	3	3	3	5	3	2	5	3	4	5	3	6	7	2	1 (0.25)
M15Ex171	2	3	3	3	5	3	2	3	3	4	5	3	6	7	1	1 (0.25)
M15Ex172	2	3	3	3	5	2	3	4	3	4	5	3	6	7	2	1 (0.25)
M15Ex173	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	5	3	6	8	3	1 (0.25)
M15Ex174	2	2	3	3	3	3	3	2	3	4	5	3	6	5	3	1 (0.25)
M15Ex175	2	3	3	3	4	3	3	4	2	4	5	2	6	5	3	1 (0.25)
M15Ex176	2	3	3	3	5	3	3	2	3	3	5	2	6	5	3	2 (0.50)
M15Ex177	2	3	3	3	4	3	3	6	3	4	5	4	7	7	3	5 (1.24)
M15Ex178	3	2	4	3	5	3	2	6	3	4	5	3	6	6	3	3 (0.74)
M15Ex179	4	3	3	3	5	3	2	2	3	4	3	3	6	4	3	1 (0.25)
M15Ex180	4	3	3	4	4	3	2	2	3	4	3	3	6	4	3	1 (0.25)
M15Ex181	2	3	3	2	4	2	3	6	3	4	4	3	6	8	3	3 (0.74)
M15Ex182	2	4	3	2	4	3	4	3	3	4	1	3	7	6	3	1 (0.25)
M15Ex183	2	4	3	2	4	3	4	3	3	4	5	3	7	6	3	3 (0.74)
M15Ex184	1	4	3	3	4	3	4	3	3	4	5	3	9	9	3	2 (0.50)
M15Ex185	4	4	3	1	5	3	2	4	3	4	6	2	5	8	3	4 (0.99)
M15Ex186	4	4	3	4	3	3	4	5	3	4	7	5	6	8	2	2 (0.50)
M15Ex187	3	4	3	2	10	2	3	2	4	3	1	3	6	8	3	13 (3.23)
M15Ex188	6	4	3	1	5	4	4	3	2	1	3	4	5	7	0	2 (0.50)
M15Ex189	6	4	3	1	5	3	4	3	2	1	3	4	5	7	0	2 (0.50)
M15Ex190	2	4	6	3	3	3	6	11	9	2	2	5	9	6	1	1 (0.25)

Tabla 9: Resultados del MLVA para los 403 aislados (continuación). Los marcadores se nombraron de acuerdo a su posición en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv. Los perfiles MLVA se enumeraron según su posición en el análisis filogenético (fig. 20). El valor decimal refleja la existencia de alelos con un tamaño intermedio.

Para el análisis filogenético usamos varias aplicaciones de MIRU-VNTR $plus$, con las que se elaboró un MST (fig. 19) y un dendrograma (fig. 20); ambos se generaron a partir de los resultados del MLVA en los 403 aislados incluidos en el análisis, y mostraron una importante variabilidad genética entre las cepas de *M. tuberculosis* de esta colección extremeña.

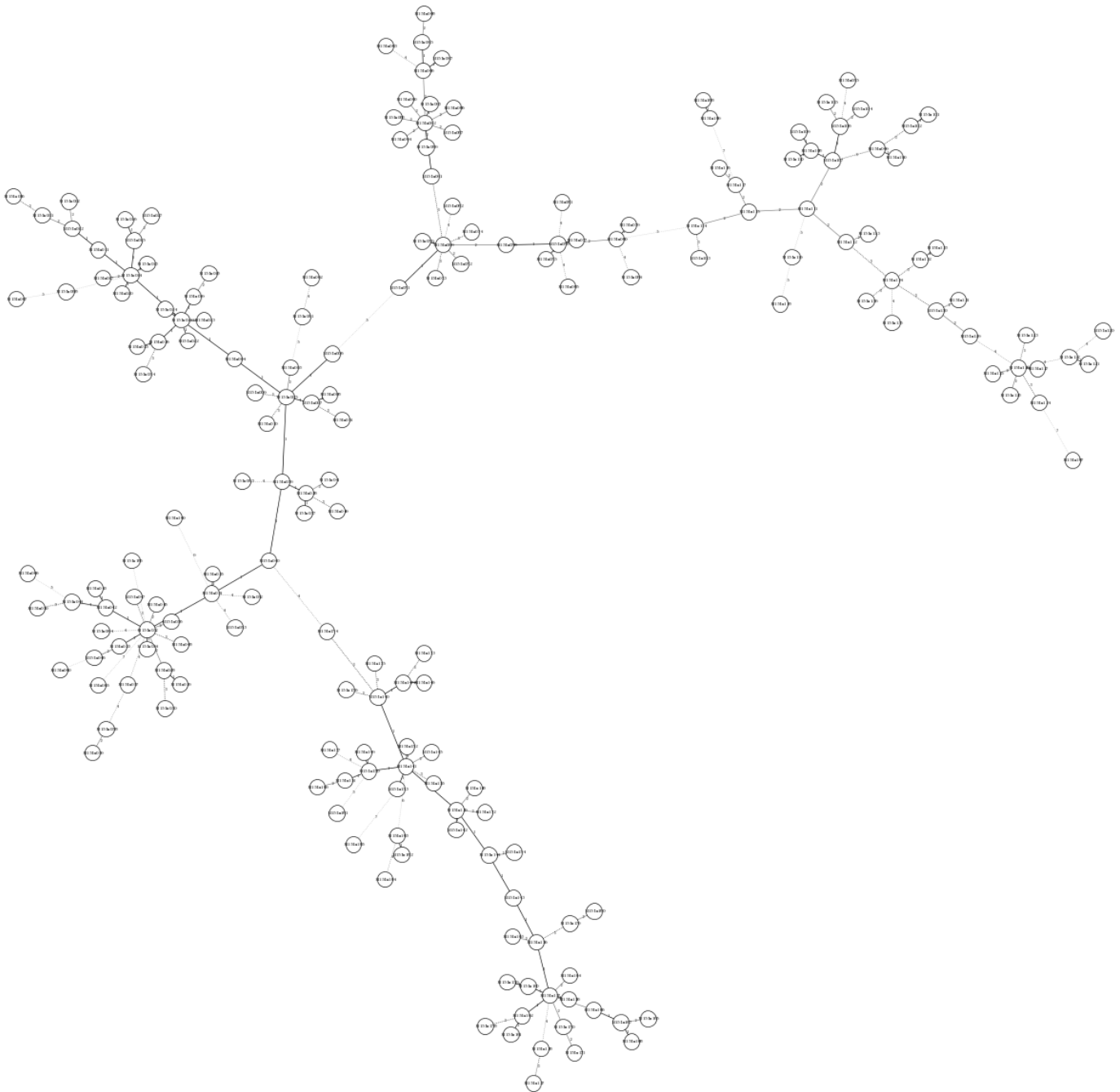


Figura 19: MST elaborado a partir de los datos del MLVA que muestra la relación genética entre las cepas de *M. tuberculosis*. Cada círculo representa un perfil MLVA distinto. La longitud de las ramas indica la distancia entre los genotipos. * Esta figura se puede ver con mayor detalle en el material suplementario aportado en formato digital.

Análisis de grupos, diversidad alélica y poder de discriminación

En primer lugar, se calculó la diversidad alélica (h) en cada uno de los 15 *loci* VNTR amplificados en los 403 aislados clínicos de *M. tuberculosis* (tabla 10). De acuerdo con el método de clasificación de Sola *et al.* (2003), siete *loci* (4052, 2163b, 802, 960, 424, 2401 y 3690) se consideraron como «altamente discriminatorios» ($h > 0.6$); seis (1955, 2165, 2996, 1644, 577 y 4156) se clasificaron como «moderadamente discriminatorios» ($0.3 \leq h \leq 0.6$); y dos VNTR (3192 y 580) mostraron un bajo poder de discriminación ($h < 0.3$). El *locus* en el que se observó mayor diversidad fue el 4052 ($h = 0.82$), mientras que el 580 ($h = 0.21$) fue el *locus* que menos variabilidad mostró. Estos resultados demuestran que, en general, la diversidad alélica observada en nuestro estudio fue bastante alta, algo que concuerda con el origen de la muestra, ya que se ha obtenido a partir de una población heterogénea. A continuación, se calculó la tasa de agrupamiento y el poder de discriminación (HGDI) acumulado en distintas combinaciones de *loci* VNTR (tabla 11); estos conjuntos se formaron con la adición sucesiva de *loci* siguiendo un orden decreciente en función de la diversidad alélica observada en cada *locus*. El HGDI del conjunto de 15 *loci* VNTR en nuestro estudio fue 0.9886; ligeramente inferior al observado en una investigación previa (HGDI = 0.995) llevada a cabo en nuestro país (Alonso-Rodríguez *et al.*, 2008). El HGDI acumulado de las combinaciones 12 (HGDI = 0.9878) y 13 (HGDI = 0.9878) fue idéntico, y, a su vez, muy similar al de la combinación 14 (HGDI = 0.9880); por su parte, las tasas de agrupamiento fueron también muy parecidas (12/68.49 %; 13/67.99 % y 14/67.74 %). Por tanto, basándonos en estos resultados, planteamos la posibilidad de seleccionar un subconjunto con los 12 *loci* VNTR más discriminatorios para su uso como técnica de primera línea para la caracterización molecular de aislados clínicos de *M. tuberculosis* en futuras investigaciones en Extremadura.

Nº de alelos ^a	Nº de aislados por <i>locus</i> VNTR														
	424	577	580	802	960	1644	1955	2163b	2165	2401	2996	3192	3690	4052	4156
0															4
1	25			72	1	6	9	4	4	90	16			2	4
2	189	28	21	86	13	97	201	72	230	193	2	34		8	258
3	72	111	357	169	162	257	171	112	150	15	56	352		15	137
4	104	259	10	60	123	43	15	150	17	105	38	14	83	38	
5	7	5	13	11	81		6	28	1		266	3	96	116	
6	6		1	4	10		1	35			18		197	62	
7			1					1			5		12	77	
8				1							2		11	56	
9									1				3	16	
10					13								1	1	
11								1							
7s														12	
<i>h</i>^b	0.67	0.50	0.21	0.72	0.70	0.52	0.57	0.74	0.53	0.65	0.53	0.22	0.66	0.82	0.47

Tabla 10: Determinación de la diversidad alélica de cada *locus* VNTR amplificado en los 403 aislados clínicos.

^a Cada alelo se corresponde con el tamaño del fragmento producido por la amplificación de todo el *locus*; como el tamaño de la unidad de repetición es conocido, se considera que el tamaño del amplicón representa el número de repeticiones en cada *locus*. **0**: Corresponde a alelos desprovistos de cualquier unidad de repetición. **s**: alelo con tamaño intermedio.

^b Diversidad alélica (*h*), calculada con la ecuación de Hunter y Gaston (1988).

Combinación de <i>loci</i>	<i>Locus</i> VNTR (<i>h</i>)	Nº de genotipos	Nº de genotipos compartidos	Nº de aislados agrupados	Nº de aislados en cada grupo	Tasa de agrupamiento %	HGDI acumulado
1	4052 (0.82)						
2	2163b (0.74)	43	32	392	2 - 45	97.27 %	0.9473
3	802 (0.72)	91	51	363	2 - 42	90.07 %	0.9675
4	960 (0.70)	128	63	338	2 - 36	83.87 %	0.9769
5	424 (0.67)	147	61	317	2 - 27	78.66 %	0.9818
6	3690 (0.66)	156	61	308	2 - 27	76.43 %	0.9832
7	2401 (0.65)	158	60	305	2 - 27	75.68 %	0.9833
8	1955 (0.56)	164	59	298	2 - 24	73.95 %	0.9843
9	2165 (0.53)	168	58	293	2 - 24	72.70 %	0.9845
10	2996 (0.53)	176	60	287	2 - 24	71.22 %	0.9859
11	577 (0.50)	181	59	281	2 - 24	69.73 %	0.9872
12	1644 (0.52)	186	59	276	2 - 24	68.49 %	0.9878
13	4156 (0.47)	187	58	274	2 - 24	67.99 %	0.9878
14	3192 (0.22)	189	59	273	2 - 24	67.74 %	0.9880
15	580 (0.21)	190	60	273	2 - 24	67.74 %	0.9886

Tabla 11: Tasa de agrupamiento y HGDI acumulado calculados con la adición sucesiva de *loci* VNTR.

DISCUSIÓN

Este es el primer estudio en Extremadura en el que se utiliza un conjunto de 15 *loci* VNTR (Supply *et al.*, 2006) para determinar el genotipo de aislados clínicos de *M. tuberculosis*. En total, se identificaron mediante el MLVA 190 genotipos diferentes. Estos resultados demuestran una importante diversidad genética de *M. tuberculosis* en nuestra región, superior a la inicialmente determinada con otro método (Apartado 10). Una característica destacable es que, en general, el análisis ha funcionado incluso con aislados almacenados durante varios años (período de estudio: 1998-2012), ya que en la mayoría de ellos se amplificaron con éxito todos los *loci* VNTR. No obstante, en un 5.68 % (n = 25) de las muestras, la ausencia de producto amplificado impidió determinar el número de repeticiones en uno o más *loci*. Curiosamente, en los *loci* que más problemas de amplificación se observaron (4052 y 4156), coincidió que, en ambos casos, los cebadores estaban marcados con el fluorocromo NED; sin embargo, mediante varias comprobaciones en geles de agarosa descartamos que pudiese deberse a un problema asociado al fluorocromo, ya que en esas pruebas tampoco se detectó amplicón alguno. Además, resultados similares a los nuestros han sido publicados recientemente en un estudio italiano en el que no se utilizó electroforesis capilar (Rindi *et al.*, 2014). La falta ocasional de amplificación de algunos *loci* también ha sido descrita en otros trabajos (Supply *et al.*, 2006; Iwamoto *et al.*, 2007; Shamputa *et al.*, 2010; Asante-Poku *et al.*, 2014). Esto podría explicarse por la aparición de deleciones, cambios de nucleótidos en las secuencias complementarias a los cebadores utilizados o una deficiente calidad del ADN (Shamputa *et al.*, 2010).

Tradicionalmente, el MLVA se ha realizado mediante electroforesis en gel de agarosa, aunque este procedimiento tiene limitaciones cuando se trata de estimar con precisión el tamaño del fragmento amplificado (Yokoyama *et al.*, 2006). En nuestro

estudio, la utilización de electroforesis capilar nos permitió observar, en los aislados identificados con el perfil M15Ex104, la existencia de alelos con un tamaño intermedio en el *locus* 4052. Posiblemente, si no hubiésemos empleado ese sistema, en lugar de asignar una fracción decimal a esa unidad de repetición, hubiéramos redondeado, que es lo más común en estas situaciones (Yokoyama *et al.*, 2006). Sin embargo, este hecho no hubiese tenido ninguna repercusión en el presente trabajo, por errores de interpretación derivados del falso agrupamiento de aislados con perfiles que no son exactamente idénticos, ya que también se observaron diferencias en otros *loci*. Además, teniendo en cuenta que solo se ha identificado una repetición con fracción decimal en un *locus* y en un único grupo de aislados, la electroforesis en gel de agarosa puede considerarse como una alternativa aceptable en laboratorios que no dispongan del equipo necesario para el análisis mediante electroforesis capilar (Jenkins *et al.*, 2010).

Por otro lado, el análisis de la diversidad alélica reveló la existencia de diferencias significativas entre algunos *loci* VNTR. Los *loci* 4052, 2163b y 802 fueron los más discriminatorios, mientras que los *loci* que mostraron una menor variabilidad fueron el 580 y el 3192. Estos resultados sugieren que algunos *loci* (4052 y 2163b) evolucionan de manera más rápida que otros (580 y 3192), o lo que es lo mismo, ciertos *loci* MIRU/ETR (580/MIRU4/ETR-D y 3192/MIRU31/ETR-E) evolucionan a un ritmo más lento en comparación con algunos *loci* QUB (4052/QUB26 y 2163b/QUB11b); algo que ya había sido advertido por otros autores (Kremer *et al.*, 2005b). Asimismo, nuestros resultados coinciden con los de varios estudios recientes en los que también se han evaluado estos *loci* VNTR con aislados del linaje Euro-americano (Asante-Poku *et al.*, 2014; Realpe *et al.*, 2014; Rindi *et al.*, 2014); grupo taxonómico al que pertenece la mayoría de nuestras cepas (Apartado 10). Por lo tanto, la eficacia de un determinado conjunto de *loci* VNTR para el genotipado de *M. tuberculosis* parece estar influenciada

en gran medida por las variantes genéticas predominantes en una zona geográfica, como se ha demostrado especialmente con la familia Beijing (Yokoyama *et al.*, 2007; Murase *et al.*, 2008).

Con la intención de optimizar este análisis, entendiendo esta optimización como la búsqueda de un conjunto de *loci* VNTR (entre los 15 evaluados) que permita reducir al mínimo el número de *loci* necesarios para una caracterización fiable de *M. tuberculosis* en Extremadura, se evaluaron diversas combinaciones para identificar un subconjunto de *loci* VNTR que proporcione una discriminación comparable a la del conjunto de 15 *loci*. El análisis combinatorio reveló que tres (4156, 3192 y 580) de los 15 *loci* aportaban poca información adicional a la obtenida con la combinación de los otros 12 *loci*; y tanto el poder de discriminación como la tasa de agrupamiento de este subconjunto de 12 *loci* (HGDI = 0.9878; 68.49 %) eran muy similares a los valores obtenidos con el conjunto completo (HGDI = 0.9886; 67.74 %). Con estos datos, se propone el uso del MLVA con un subconjunto compuesto por los 12 *loci* VNTR más discriminatorios de este estudio como técnica de primera línea para el genotipado de aislados clínicos de *M. tuberculosis* en Extremadura. Además de ahorrar tiempo y trabajo, también se conseguiría reducir en un 20 % el gasto asociado al genotipado. Recientemente se ha estimado un coste de 168.60 dólares por cada muestra analizada con el conjunto completo de 15 *loci* (Asante-Poku *et al.*, 2014). Si tomamos esa cantidad como referencia, el ahorro en nuestro caso sería de unos 30 euros por muestra.

En conclusión, la realización del MLVA mediante el uso de un sistema automatizado basado en la electroforesis capilar ofrece rapidez, precisión, alto rendimiento y perfecta reproducibilidad. Se ha identificado un conjunto reducido de 12 *loci* que se puede aplicar para la diferenciación de aislados de *M. tuberculosis* en futuras investigaciones en Extremadura, y posiblemente en el resto de España; si bien, sería

fundamental confirmar estos resultados con la oportuna información epidemiológica, así como investigar con aislados de otras regiones. Al mismo tiempo, se debería comprobar si la capacidad de discriminación tanto del conjunto de 15 *loci* VNTR como de ese subconjunto de 12 *loci* mejora cuando se combina con otros métodos.

12. Uso combinado del MLVA y el espoligotipado para el estudio de la diversidad genética de *Mycobacterium tuberculosis*

RESUMEN

Los resultados del espoligotipado y el MLVA obtenidos en análisis previos se analizaron de forma conjunta con el objetivo de evaluar la utilidad de combinar ambos métodos para el estudio de la diversidad genética de *M. tuberculosis* en Extremadura, así como para dilucidar ciertos aspectos evolutivos. El estudio combinado de los resultados mostró que la complejidad existente entre la población de cepas de *M. tuberculosis* en Extremadura fue mayor de la observada con cada método por separado. La asociación entre el conjunto convencional de 15 *loci* VNTR y el espoligotipado permitió la identificación de 206 genotipos distintos en 403 aislados. La discriminación más alta se logró cuando se utilizó esta combinación (HGDI = 0.9905). Hubo nueve grupos con perfiles MLVA compartidos que se dividieron al incluir en el análisis los resultados del espoligotipado. Dos de estos grupos con idéntico perfil MLVA pero distintos espoligotipos estaban formados en su totalidad por aislados resistentes a la isoniacida. Nuestros resultados demuestran que el uso combinado del espoligotipado y el MLVA es una estrategia de genotipado adecuada para el estudio de la diversidad genética de *M. tuberculosis* en Extremadura, pudiendo contribuir también al esclarecimiento de determinadas relaciones evolutivas.

ABSTRACT

The results previously obtained by spoligotyping and MLVA assays were analyzed together to assess the contributions of the two methods for the study of the genetic diversity of *M. tuberculosis* in Extremadura as well as to elucidate certain

evolutionary aspects. The results of using a combination of these two techniques showed more complexity than those obtained using either technique alone. The highest discrimination (HGDI = 0.9905) was achieved using a defined set of 15 VNTR loci combined with spoligotyping which allowed to identify 206 different genotypes in 403 isolates. The VNTR analysis established nine groups with share MLVA profile but the inclusion of spoligotyping analysis allowed their subtyping. Two of these groups with identical MLVA profile but different spoligotypes were composed entirely of isoniazid-resistant isolates. Our results show that the combined use of spoligotyping and MLVA methods is an appropriate genotyping strategy for the study of the genetic diversity of *M. tuberculosis* in Extremadura and may also contribute to the explanation of certain evolutionary relationship.

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la *filogeografía* de las poblaciones de *M. tuberculosis* ha permitido demostrar la existencia de asociaciones entre los principales linajes filogenéticos y las poblaciones humanas en todo el mundo, lo cual puede tener importantes consecuencias en el desarrollo de estrategias para controlar la TB. El espoligotipado es actualmente uno de los métodos más utilizados para el estudio de la *filogeografía* del MTBC, debido a su rapidez, simplicidad, bajo coste y alta reproducibilidad (Kremer *et al.*, 1999). A pesar de que se ha demostrado que el espoligotipado es un método útil para clasificar las cepas de *M. tuberculosis* dentro de los principales linajes filogenéticos en una zona determinada (Kato-Maeda *et al.*, 2011), la tendencia de esta técnica a sobreestimar la proporción de aislados agrupados y las evidencias encontradas de evolución convergente en el *locus* DR de *M. tuberculosis* (Flores *et al.*, 2007; Fenner *et al.*, 2011; Rindi *et al.*, 2012), hacen que sea recomendable

combinarlo con otros métodos, más discriminatorios o basados en marcadores moleculares menos propensos a exhibir homoplasia, si se desea resolver cuestiones epidemiológicas o dilucidar aspectos evolutivos (Comas *et al.*, 2009).

La caracterización molecular de aislados clínicos de *M. tuberculosis* es parte de un proyecto diseñado para determinar la utilidad del genotipado en el estudio de la TB en un entorno de baja incidencia como Extremadura. Este es el primer trabajo de investigación basado en dos métodos complementarios (espoligotipado y MLVA) que describe los genotipos de *M. tuberculosis* presentes en esta región. Los resultados se analizaron retrospectivamente con el objetivo de evaluar de forma conjunta las aportaciones de ambos métodos para el estudio de la diversidad genética de *M. tuberculosis* en Extremadura, así como para el esclarecimiento de ciertas relaciones evolutivas planteadas previamente a partir de la información obtenida con cada método por separado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra de estudio

Los resultados del MLVA en los 403 aislados clínicos de *M. tuberculosis* incluidos en un análisis previo (Apartado 11) se analizaron junto con los datos obtenidos mediante el espoligotipado en esas mismas muestras (Apartado 10). La nomenclatura empleada para designar tanto a los espoligotipos como a los perfiles MLVA fue idéntica a la utilizada en apartados anteriores (10 y 11).

Análisis combinado del MLVA y el espoligotipado

Los resultados del espoligotipado y el MLVA se combinaron y analizaron mediante un coeficiente categórico en MIRU-VNTR*plus* (www.miru-vntrplus.org);

aplicación con la que se generaron diferentes dendrogramas, usando el UPGMA como algoritmo de agrupación. Cada grupo se formó con dos o más aislados con idéntico espoligotipo y perfil MLVA. La tasa de agrupamiento y el poder de discriminación (HGDI) de cada método, así como de las distintas combinaciones de estos, se calcularon de igual forma que en el apartado 11.

Análisis filogenético

Para analizar la relación evolutiva entre los aislados extremeños se elaboraron varios MST, con el *software* InfoQuest™ FP (Bio-Rad, EE. UU.), a partir de los datos obtenidos con el espoligotipado y el MLVA.

RESULTADOS

El estudio combinado de los resultados del espoligotipado y el MLVA mostró una elevada diversidad genética entre los 403 aislados clínicos de *M. tuberculosis* incluidos en el análisis. Así, utilizando el conjunto de 15 *loci* VNTR en combinación con el espoligotipado, se detectaron 206 genotipos distintos, incluyendo 144 cepas únicas. El 64.26 % (n = 259) de los aislados se distribuyeron en 62 grupos. El tamaño de los grupos varió entre dos y 21 aislados. Cabe destacar que el uso combinado del espoligotipado y el subconjunto de 12 *loci* propuesto anteriormente (Apartado 11), generó solo un genotipo menos (205); por su parte, el porcentaje de aislados agrupados fue idéntico, aunque se formó un grupo menos (61). Entre los métodos evaluados, o combinación de estos, el espoligotipado fue el que menor capacidad mostró para diferenciar entre cepas (HGDI = 0.9595). La discriminación más alta se logró cuando se utilizaron juntos el espoligotipado y el MLVA-15 *loci* (HGDI = 0.9905). El HGDI observado en el análisis exclusivo del conjunto completo de 15 *loci* fue ligeramente

inferior (HGDI = 0.9886). La capacidad discriminatoria del binomio «espoligotipado + MLVA-12 *loci*» fue prácticamente igual a la conseguida con la otra combinación (tabla12).

Método	Nº de genotipos diferentes	Nº de aislados con genotipo único	Nº de genotipos compartidos	Nº de aislados agrupados	Tasa de agrupamiento %	HGDI
Espoligotipado	98	54	44	349	86.60 %	0.9595
MLVA 12 <i>loci</i>	186	127	59	276	68.49 %	0.9878
MLVA 15 <i>loci</i>	190	130	60	273	67.74 %	0.9886
Espoligotipado + MLVA-12 <i>loci</i>	205	144	61	259	64.27 %	0.9900
Espoligotipado + MLVA-15 <i>loci</i>	206	144	62	259	64.27 %	0.9905

Tabla 12: Comparación de la capacidad discriminatoria de varios métodos, o combinaciones de estos, para la caracterización molecular de aislados de *M. tuberculosis* de Extremadura.

Nuestros resultados demuestran que solo una pequeña parte de los grupos definidos mediante el MLVA se fraccionó al incluir en el análisis los datos correspondientes al espoligotipado. En este sentido, nueve de los 60 grupos con perfiles MLVA compartidos se dividieron al asociarse los dos métodos (tabla 13). Lo más llamativo se observó en el perfil M15Ex021, que unificaba a 11 aislados en un solo grupo en el que se identificaron siete espoligotipos diferentes: SIT53 (n = 3), SIT373 (n = 3), SIT37 (n = 1), SIT2409 (n = 1), SIT191 (n = 1), NSIT02 (n = 1) y NSIT18 (n = 1). Por su parte, el M15Ex163 (n = 9) se dividió en dos grupos, uno integrado por siete aislados (SIT50) y otro formado por dos aislados (SIT47); lo destacable en este caso fue que los nueve aislados mostraron resistencia frente a la isoniacida. Curiosamente, en el perfil M15Ex089 se observó una situación similar, ya que todos los aislados del grupo (seis con SIT33 y uno con NSIT06) eran también resistentes a ese mismo antimicrobiano. La asociación entre el espoligotipado y el MLVA-12 *loci* resultó algo más eficaz, puesto que se dividieron los mismos grupos, incluido uno que contenía

aislados con el espoligotipo SIT2 junto a otros con SIT46 y NSIT19, y además se diferenciaron dos espoligotipos distintos en sendos grupos compuestos por aislados que presentaban el mismo número de copias en cada uno de esos 12 *loci* (tabla 14).

La elaboración de tres MST a partir de los aislados con los tres espoligotipos más prevalentes (SIT42, SIT50 y SIT106) nos permitió comprobar que la complejidad existente entre la población de cepas de *M. tuberculosis* en Extremadura fue mayor de la inicialmente observada con el espoligotipado. En el grupo de aislados con SIT42 (n = 46) se distinguieron 18 perfiles MLVA diferentes, dos menos que en los 43 aislados con SIT50; por su parte, en el grupo del SIT106 (n = 29) se detectaron tres perfiles distintos. En el complejo con el SIT42, las cepas que mayor distancia genética mostraron (M15Ex059 y M15Ex83), se aislaron en pacientes cuyo país de origen era Marruecos (fig. 21).

Las relaciones genéticas entre los 403 aislados de *M. tuberculosis* incluidos en el análisis se visualizaron mediante un MST elaborado con los espoligotipos y los perfiles MLVA (15 *loci*) identificados en estas muestras (fig. 22). En general, se distinguieron de forma clara los aislados pertenecientes a cada una de las principales familias, existiendo una separación evidente entre las diferentes agrupaciones. En esta representación se pudo observar la proximidad genética entre los aislados con espoligotipo SIT42 y aquellos con SIT2652; también se apreció la misma proximidad entre los aislados con SIT58 y aquellos con NSIT13, así como entre un aislado con espoligotipo SIT167 y dos con NSIT05. En todos los casos se identificó una variación alélica en dos *loci* entre los respectivos perfiles MLVA.

Perfil MLVA	Perfil de espigotipo														Nº de aislados			
	424	577	580	802	960	1644	1955	2163b	2165	2401	2996	3192	3690	4052		4156		
M15Ex021	2	4	3	2	3	4	2	4	2	2	5	3	6	5	2		SIT53	3
																	SIT373	3
																	SIT37	1
																	SIT2409	1
																	SIT191	1
																	NSIT02	1
																	NSIT18	1
M15Ex026	2	4	3	2	3	4	2	4	2	2	4	3	6	5	2		SIT7	1
																	ORPHAN04	1
M15Ex031	2	4	3	3	3	3	2	3	3	2	5	3	6	5	2		SIT58	3
																	NSIT15	1
M15Ex032	2	4	3	4	3	3	2	3	3	2	5	3	6	5	2		SIT58	5
																	SIT1227	2
																	SIT68	1
M15Ex069	4	4	3	3	4	3	2	4	2	2	3	3	4	7	2		SIT106	21
																	ORPHAN02	2
																	SIT105	1
M15Ex079	6	4	3	3	4	3	3	4	2	2	5	3	4	6	2		SIT33	1
																	SIT130	1
M15Ex089	3	2	3	3	4	2	3	3	2	2	5	3	4	7	2		SIT33	6
																	NSIT06	1
M15Ex150	2	3	3	3	5	3	3	6	3	4	5	3	6	6	3		SIT46	1
																	NSIT19	3
M15Ex163	3	3	3	3	5	3	2	6	3	4	5	3	6	4	3		SIT50	7
																	SIT47	2

Tabla 13: Grupos de aislados con idéntico perfil MLVA pero distinto espigotipo que se dividieron al combinar el espigotipado y el MLVA-15 loci.

Perfil MLVA	Perfil de espigotipo											Nº de aislados			
	424	577	802	960	1644	1955	2163b	2165	2401	2996	3690		4052		
	2	3	3	5	3	3	6	3	4	5	6	6		SIT46	1
														NSIT19	3
														SIT2	5
	2	4	2	3	4	2	3	2	2	6	6	5		NSIT05	2
														NSIT09	1
	2	4	4	3	3	2	3	3	2	4	6	5		SIT50	1
														NSIT07	1

Tabla 14: Grupos adicionales que se dividieron al utilizar de forma conjunta el espigotipado y el MLVA-12 loci.

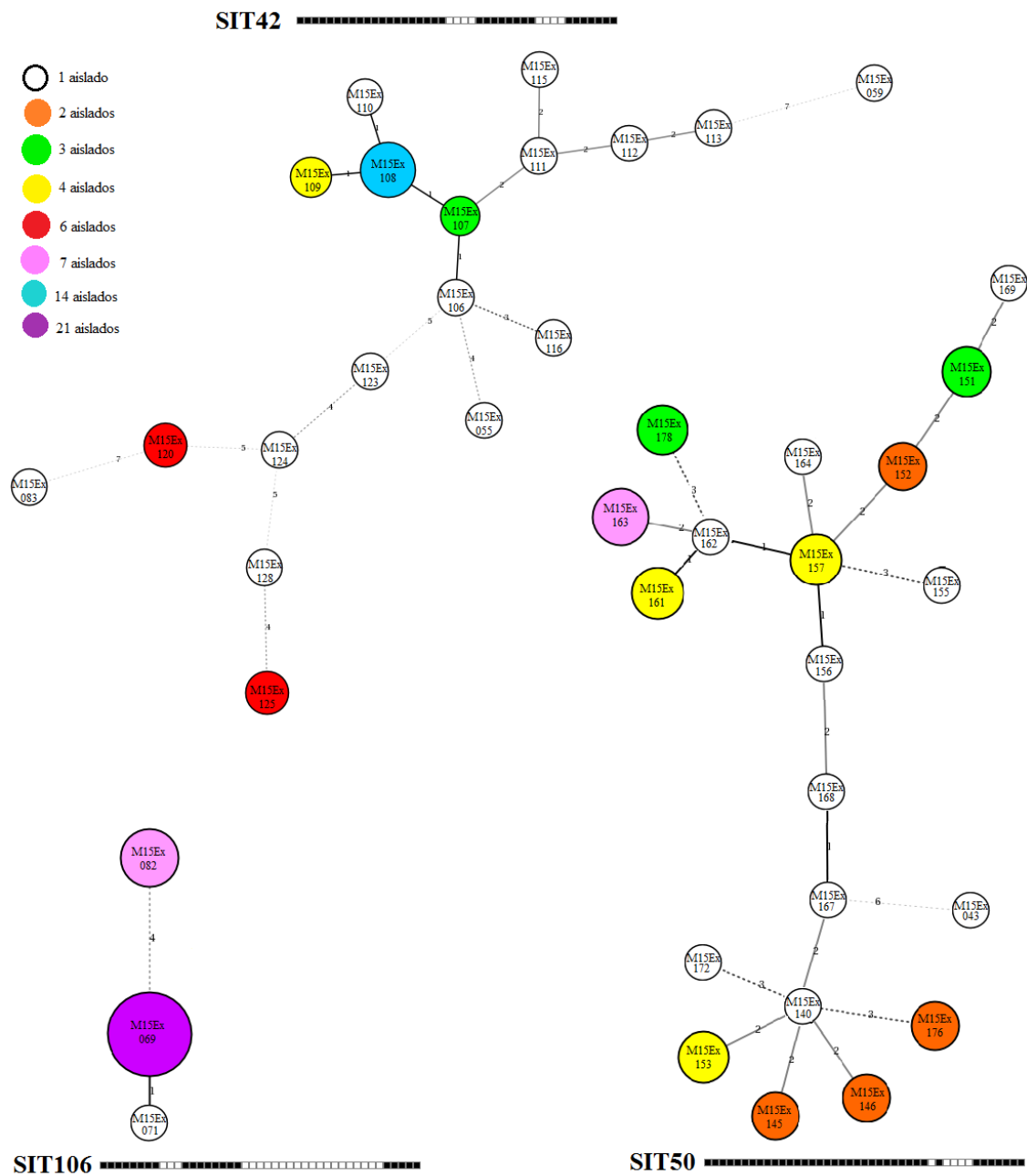


Figura 21: MST elaborados a partir de los aislados con los tres espoligotipos más prevalentes en Extremadura. El árbol filogenético conecta cada genotipo en función de los cambios en el número de repeticiones entre perfiles. Cada perfil MLVA está representado por un círculo. El tamaño del círculo es proporcional al número total de aislados y el color de los círculos también indica el número de aislados de cada perfil MLVA. La longitud de las ramas representa la distancia entre los perfiles, mientras que la forma de las líneas indica el número de alelos diferentes entre dos perfiles: líneas continuas, uno o dos cambios (las más gruesa representan un solo cambio, mientras que las más delgadas indican dos cambios); líneas grises discontinuas con rayas representan 3 o más cambios.

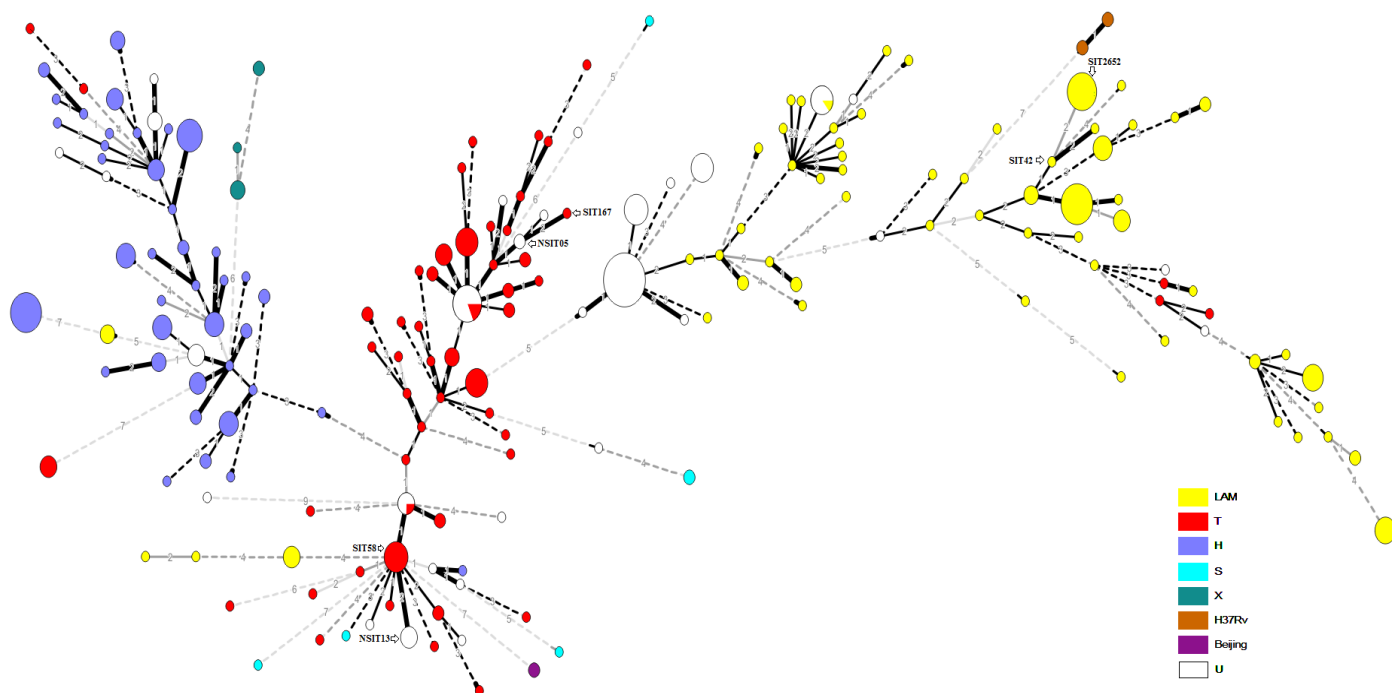


Figura 22: MST, compuesto con los resultados obtenidos en el MLVA y el espigotipado, que ilustra la relación evolutiva entre los 403 aislados de *M. tuberculosis*. El árbol filogenético conecta cada genotipo en función de los cambios en el número de repeticiones entre perfiles. Cada perfil MLVA está representado por un círculo. El tamaño del círculo es proporcional al número total de aislados. El color de los círculos indica la familia (según la clasificación basada en el espigotipado) a la que pertenece cada genotipo. Los círculos en blanco se corresponden con los genotipos cuya familia es desconocida (U) según la base de datos SITVITWEB. La longitud de las ramas representa la distancia entre los perfiles, mientras que la forma de las líneas indica el número de alelos diferentes entre dos perfiles: líneas continuas, uno o dos cambios (las más gruesa representan un solo cambio, mientras que las más delgadas indican dos cambios); las líneas negras discontinuas representan tres cambios y las grises discontinuas cuatro o más cambios.

DISCUSIÓN

Esta es la primera vez que se utiliza de forma combinada el espigotipado y el MLVA para estudiar la diversidad genética de *M. tuberculosis* en Extremadura. Nuestros resultados demuestran que la población de cepas de *M. tuberculosis* en esta región es muy heterogénea, ya que se identificaron 206 genotipos diferentes. Esta cifra es incluso superior si tenemos en cuenta que en el análisis combinado de los resultados del espigotipado y el MLVA no se incluyeron 10 aislados en los que se identificó un espigotipo único (SIT3, SIT4, SIT36, SIT124, SIT276, SIT746, SIT866, SIT1541, NSIT08 y NSIT10); por lo tanto, en la colección completa de aislados extremeños existirían como mínimo otras 10 cepas de *M. tuberculosis* distintas.

Aunque el MLVA proporcionó una buena diferenciación entre cepas, superior a la obtenida inicialmente con el espoligotipado, se ha observado que la adición de este otro método mejora ligeramente la capacidad discriminatoria del análisis con marcadores VNTR. Estos resultados coinciden con lo publicado en diversos estudios (Oelemann *et al.*, 2007; Allix-Béguec *et al.*, 2008a; Mulenga *et al.*, 2009; Cardoso-Oelemann *et al.*, 2011; Realpe *et al.*, 2014). Como era de esperar, la mejor discriminación se logró con el uso combinado del MLVA-15 *loci* y el espoligotipado, si bien, la asociación del MLVA-12 *loci* con el espoligotipado ofreció unos resultados muy similares; el alto HGDI observado, indica que esta combinación permite clasificar correctamente cepas estrechamente relacionadas, por lo que debería ser una alternativa a tener en cuenta para futuras investigaciones en nuestra región.

Por otro lado, resultó desconcertante encontrar aislados (n =16) resistentes a la isoniacida que se agruparon en dos complejos, y en cada uno de los cuales se identificó un único perfil MLVA pero dos espoligotipos diferentes. Así, por ejemplo, se pudo observar que el uso combinado de ambos métodos dividió a los nueve aislados con el perfil M15Ex163 en dos grupos, y cada uno estaba compuesto por aislados resistentes a la isoniacida con un espoligotipo distinto (SIT47 o SIT50). Descartamos que pudiera deberse a interpretaciones erróneas durante la lectura del perfil de espoligotipo (en dos casos se detectó esta circunstancia, que fue corregida a lo largo de la investigación) o a una incorrecta asignación de los alelos. Una explicación posible es que las mismas mutaciones de resistencia se adquirieran de forma independiente, algo no descartable si las mutaciones en cuestión son las más comunes y, por consiguiente, las que más probabilidades tienen de ser adquiridas. Aunque parece demasiada casualidad, esto mismo podría valer para el grupo con el perfil M15Ex089. Otro escenario posible es que se haya producido una microevolución de genotipos, resistentes a la isoniacida, por la

pérdida de espaciadores en el *locus* DR (Fang *et al.*, 1998; Soini *et al.*, 2000; van Embden *et al.*, 2000; Warren *et al.*, 2002), tanto en el caso del SIT50 (posible origen del SIT47) como en el SIT33 (posible origen del NSIT06), que no habría afectado a ninguno de los 15 *loci* VNTR analizados (Al-Hajoj *et al.*, 2010). Asimismo, este fenómeno se podría achacar también a la homoplasia en marcadores VNTR, hecho que ya ha sido descrito por otros autores (Homolka *et al.*, 2012; Reyes *et al.*, 2012; Rindi *et al.*, 2014), o a la falta de discriminación del conjunto de 15 *loci* VNTR empleado, no siendo descartable que con la amplificación de un conjunto más amplio de *loci* se pudiera diferenciar correctamente esas cepas también con el MLVA. Lamentablemente, con las técnicas usadas y la información disponible, no es posible determinar con exactitud la causa de este fenómeno.

El espoligotipado ha demostrado ser una técnica válida para clasificar las cepas de *M. tuberculosis* dentro de los principales linajes filogenéticos (Kato-Maeda *et al.*, 2011). Sin embargo, para resolver cuestiones epidemiológicas o dilucidar aspectos evolutivos debe ser combinado con otros métodos más discriminatorios (Comas *et al.*, 2009). Algunos autores consideran que, a diferencia del espoligotipado (Rindi *et al.*, 2012), el MLVA 15 *loci* puede ser un método apropiado para el análisis filogenético del linaje Euro-americano (Rindi *et al.*, 2014). Así pues, la proximidad genética observada entre los aislados con el perfil M15Ex104 (SIT2652) y aquellos con los perfiles M15Ex105, -106 o -107 (SIT42), apoyaría el hipotético escenario planteado en el apartado 10 sobre la relación evolutiva de esos genotipos. Lo mismo ocurriría entre los aislados con el perfil M15Ex045 (NSIT13) y los que presentaban los perfiles M15Ex032, -033 o -034 (SIT58); así como entre dos aislados con M15Ex015 (NSIT05) y uno en el que se identificó el perfil M15Ex027 (SIT167). Mientras que las mutaciones en la región DR son unidireccionales e irreversibles, debido a que se pueden perder

espaciadores pero nunca ganarlos (van Embden *et al.*, 2000; Warren *et al.*, 2002), la variación en el número de secuencias que se repiten de forma consecutiva en un *locus* VNTR puede ser el resultado de mutaciones bidireccionales, siendo posible tanto el incremento como la reducción en el número de repeticiones (Ozcaglar *et al.*, 2012). Esto dificulta el establecimiento de relaciones evolutivas únicamente a partir de la información suministrada por el MLVA; además, como hemos comprobado, la concordancia entre el MLVA y el espoligotipado no es absoluta. Por lo tanto, consideramos que el MLVA puede utilizarse como método complementario al espoligotipado para el análisis filogenético del linaje Euro-americano, pero no es una técnica completamente fiable como para ser empleada de forma exclusiva en la resolución de cuestiones evolutivas.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que el uso combinado del espoligotipado y el MLVA 15 *loci* es una estrategia de genotipado adecuada para el estudio de la diversidad genética de *M. tuberculosis* en Extremadura; pudiendo contribuir también al esclarecimiento de determinadas relaciones evolutivas. Sin embargo, basándonos solo en estas dos técnicas no hemos podido encontrar una respuesta convincente que explique por qué la gran mayoría de los aislados resistentes a la isoniacida de nuestro estudio presentaron perfiles MLVA idénticos pero distintos espoligotipos.

Parte III
Epidemiología molecular de la
tuberculosis humana en Extremadura

13. Factores asociados con la agrupación de casos de tuberculosis en Extremadura

RESUMEN

Se ha realizado un estudio epidemiológico retrospectivo de base poblacional en el que se incluyeron todos los aislados clínicos del MTBC reunidos entre enero de 1998 y mayo de 2012 en el Laboratorio de Microbiología del Complejo Hospitalario de Cáceres. El objetivo del estudio fue describir los factores asociados con la agrupación de casos de TB y determinar la influencia de la transmisión reciente en la distribución de la enfermedad en la población extremeña. Los aislados clínicos del MTBC se caracterizaron mediante el espigotipado y el MLVA. Los datos sociodemográficos, clínicos y epidemiológicos de los pacientes se obtuvieron a partir de la historia clínica. Se analizaron 445 casos con cultivo positivo, de los cuales cinco (1.1 %) se consideraron falsos positivos por contaminación cruzada en el laboratorio. De los 432 aislados clínicos incluidos en el análisis de datos, 259 (59.9 %) se encontraban agrupados en 62 clústeres y 173 (40.1 %) se correspondieron con genotipos únicos. El análisis bivariante mostró que los factores de riesgo asociados a la formación de clústeres fueron: la edad inferior a 30 años (OR = 3.24 / IC del 95 % [1.95-5.40]), ser autóctono (OR = 4.33 / IC del 95 % [1.87-10.03]) y la localización pulmonar de la enfermedad (OR = 2.48 / IC del 95 % [1.46-4.21]). Los resultados de este trabajo ponen de manifiesto que una parte importante, aproximadamente el 45 %, de los casos de TB en Extremadura podría ser atribuida a la transmisión reciente; esto implica la necesidad de intensificar las medidas de búsqueda activa de casos entre los contactos de pacientes con TB.

ABSTRACT

We performed a population-based retrospective epidemiological study which included all clinical isolates of MTBC collected between January 1998 and May 2012 in the microbiology laboratory of Caceres Hospital. The aim of the study was to describe the factors associated with clustering in TB cases and determine the influence of recent transmission in the distribution of the disease among the population of Extremadura (southwestern Spain). Clinical isolates of MTBC were characterized by spoligotyping and MLVA. Socio-demographic, clinical and epidemiological data of the patients were obtained from their medical records. 445 culture-positive cases of TB were analyzed, of which five (1.1 %) were considered false positive cultures due to laboratory cross-contamination. Among the 432 clinical isolates included into the data analysis 259 (59.9 %) were grouped into 62 clusters and 173 (40.1 %) showed unique genotypes. The bivariate analysis showed that the risk factors associated with clustering in this population were: age less than 30 years (OR = 3.24 / 95 % CI [1.95-5.40]), be indigenous (OR = 4.33 / 95 % [1.87-10.03]) and pulmonary disease location (OR = 2.48 / 95 % CI [1.46-4.21]). The results of this work show that a significant portion, about 45 % of TB cases in Extremadura, could be attributed to recent TB transmission; which increase the need of screening TB active cases among contacts of TB patients.

INTRODUCCIÓN

Los estudios poblacionales que han incorporado los métodos de biología molecular al análisis de la TB han mejorado nuestro conocimiento sobre cómo se transmite la enfermedad. Muchos de estos trabajos han demostrado que, incluso en países con baja incidencia de TB, un elevado porcentaje de casos se presenta en «clústeres» (Alland *et al.*, 1994; Small *et al.*, 1994); es decir, grupos de pacientes

infectados con la misma cepa. Generalmente se asume que estos casos agrupados son el resultado de la transmisión reciente, mientras que los pacientes con genotipos únicos se supone que representan una transmisión remota y la reactivación endógena de infecciones adquiridas hace mucho tiempo (Small *et al.*, 1994; Mathema *et al.*, 2008). Por lo tanto, el porcentaje de casos agrupados reflejaría, en los estudios poblacionales, el grado de transmisión reciente de la enfermedad (Iñigo Martínez *et al.*, 2000).

En España se han realizado numerosos estudios para conocer la proporción de casos de TB que puede ser atribuida a la transmisión reciente y poder identificar los factores de riesgo que permiten definir los patrones de transmisión de la enfermedad (Samper *et al.*, 1998; Iñigo Martínez *et al.*, 2000; Elizaga *et al.*, 2002; Ruiz García *et al.*, 2002; Iñigo Martínez *et al.*, 2003; Pena *et al.*, 2003; Cacho Calvo *et al.*, 2005; Iñigo *et al.*, 2007; López-Calleja *et al.*, 2007; Martínez-Lirola *et al.*, 2008; Lucerna *et al.*, 2011).

En línea con estos trabajos, se ha llevado a cabo un estudio de epidemiología molecular de base poblacional con el objetivo de describir los factores asociados con la agrupación de casos de TB y determinar la influencia de la transmisión reciente en la distribución de la enfermedad en la población extremeña. Para ello, se ha combinado la información procedente de la caracterización molecular de los aislados clínicos mediante el espoligotipado (Kamerbeek *et al.*, 1997) y el MLVA (Supply *et al.*, 2006) con los datos obtenidos en la investigación epidemiológica clásica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colección de aislados clínicos

Se ha realizado un estudio retrospectivo de base poblacional en el que se incluyen todos los aislados clínicos del MTBC reunidos entre enero de 1998 y mayo de

2012 en el Laboratorio de Microbiología del Complejo Hospitalario de Cáceres. Este centro, situado en el Hospital San Pedro de Alcántara, es el «Laboratorio de Referencia Autonómico de Micobacterias» de Extremadura, y recibe aislados de otros hospitales extremeños para su identificación y antibiograma. En concreto, se recibieron muestras de pacientes diagnosticados en los otros tres hospitales de la provincia de Cáceres (Plasencia, Coria y Navalmoral de la Mata), así como en los hospitales del Área de Salud de Don Benito-Villanueva de La Serena (Badajoz). Además, entre las muestras analizadas se incluye también un aislado de *M. africanum* remitido desde el Hospital Infanta Cristina (Badajoz). Para el presente trabajo, solo se ha tenido en cuenta un único aislamiento por episodio de TB activa. El cultivo bacteriológico, la identificación de la especie y las pruebas de sensibilidad a los antibióticos, así como la extracción de ADN para el análisis genotípico, se realizaron como se ha descrito previamente (Apartado 10).

Genotipado

Los aislados clínicos del MTBC se caracterizaron en el Laboratorio de Micobacterias del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Extremadura, usando el espoligotipado (Kamerbeek *et al.*, 1997) y el MLVA (Supply *et al.*, 2006) como se describe en los apartados 10 y 11, respectivamente. Se consideró que un perfil MLVA incompleto (ausencia de alelo en uno o más *loci* VNTR) o que presentaba dos alelos en uno o más *loci* VNTR, se correspondía con un genotipo único cuando en esa muestra se identificó un espoligotipo único o, si se trataba de un espoligotipo compartido, no se encontró una relación epidemiológica entre pacientes con perfiles que pudieran ser idénticos.

Características de los pacientes

Los datos sociodemográficos, clínicos y epidemiológicos de los pacientes se obtuvieron a partir de la historia clínica. La recogida de información se realizó según un protocolo que incluía las siguientes variables: sexo del paciente; edad; lugar de residencia; país de origen; situación social; profesión; padecimiento de otra enfermedad (respiratoria, cáncer, sida, diabetes y/u otras); información referente al consumo de tabaco, alcohol y otras drogas; manifestaciones clínicas (tos y expectoración, signos y síntomas generales, adenopatía, derrame pleural y/u otras); resultado de la prueba de la tuberculina; localización anatómica de la enfermedad; antecedentes personales de TB, y contacto con familiares, amigos o conocidos diagnosticados de TB. La búsqueda de información se realizó en colaboración con el Servicio de Neumología del Complejo Hospitalario de Cáceres. Los datos de los pacientes que no fueron atendidos en dicho centro se consiguieron a través de «JARA», un sistema integrado de información sanitaria del Servicio Extremeño de Salud que permite consultar la «historia clínica electrónica» del paciente. Toda esta información se completó con los datos microbiológicos, disponibles en los informes del archivo del Laboratorio de Microbiología del Complejo Hospitalario de Cáceres, y se registró en una hoja de Excel (Microsoft Office) junto con los resultados del genotipado. Esta investigación contó con la aprobación de la Comisión de Bioética de la Universidad de Extremadura y el Comité Ético de Investigación Clínica del Complejo Hospitalario de Cáceres.

Detección de contaminación cruzada en el laboratorio

La investigación de posibles casos con cultivos falsos positivos se llevó a cabo tras la revisión de las historias clínicas, que fue posterior a la caracterización molecular de los aislados. Se consideró que se había producido una contaminación cruzada en el

laboratorio en aquellos casos en los que el paciente solo disponía de un cultivo con crecimiento, el resultado de la baciloscopia era negativo, no había clínica que apoyara el diagnóstico de TB, presentaba un genotipo idéntico (mismo espoligotipo y perfil MLVA) al de una muestra de un paciente bacilífero procesada en el mismo laboratorio dentro de un intervalo de siete días y, además, no existía ninguna relación epidemiológica entre ambos pacientes (de Boer *et al.*, 2002). Estos casos no se incluyeron en el análisis de los datos.

Definición de clúster y estimación de la transmisión reciente

Los resultados del espoligotipado y el MLVA se combinaron y se analizaron con el *software* InfoQuest™ FP (Bio-Rad, EE. UU.), con el que se elaboró un dendrograma, utilizando el coeficiente categórico como medida de distancia genética y el UPGMA como algoritmo de agrupación. Un clúster se definió como la agrupación compuesta por dos o más casos cuyos aislados compartían espoligotipos y perfiles MLVA idénticos. Se asumió que los casos agrupados eran el resultado de una infección recién adquirida, mientras que los casos no agrupados (genotipos únicos) se atribuyeron a la reactivación de la infección latente (Small *et al.*, 1994; Mathema *et al.*, 2008). El índice de transmisión reciente (*recent transmission index*, RTI) se calculó con la fórmula: $RTI_{n-1} = (n_c - c) / n$; donde n_c es el número total de casos agrupados, c el número de clústeres y n es número total de casos en la muestra (Small *et al.*, 1994; Tanaka y Francis, 2005). Este método, conocido como «n menos uno», presupone que un caso de cada clúster se originó por una reactivación endógena y, por lo tanto, debe ser eliminado de los casos agrupados (Murray, 2002). Se consideró que los pacientes con la fecha de aislamiento más antigua representaban los casos índice de cada grupo (Metcalf *et al.*, 2010). Los

vínculos epidemiológicos entre los casos agrupados en clústeres se clasificaron del siguiente modo (Jonsson *et al.*, 2014):

- Evidente: familiares o contactos sociales (amigos, compañeros de trabajo...).
- Posible: misma localidad de residencia o poblaciones cercanas.
- Desconocido: falta de vínculos conocidos entre los casos.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de forma diferenciada según el tipo de variable; para las cualitativas se aplicó el cálculo de frecuencias absolutas y porcentajes, mientras que para las cuantitativas se calcularon los siguientes estadísticos descriptivos: media, desviación típica, máximo y mínimo. También se trató de identificar los factores asociados a la transmisión reciente. El análisis se basó en la comparación entre el grupo de casos agrupados en clústeres y el grupo de casos únicos, valorando la existencia de diferencias estadísticamente significativas en la distribución de cada una de las variables estudiadas: sexo, edad, lugar de residencia, origen del paciente, infección por VIH, cáncer, diabetes, consumo de tabaco, alcoholismo, consumo de drogas por vía parenteral (CDVP) y localización anatómica de la TB. La asociación entre las variables dependientes (pertenencia o no a clúster) con el resto de variables se determinó, calculando *odds ratio* (OR) y sus respectivos intervalos de confianza (IC) del 95 %, mediante análisis bivariantes. Asimismo, se estudió la existencia de diferencias en la distribución de casos agrupados y casos únicos entre las familias de cepas. Para ello se utilizó la prueba χ^2 («Chi-cuadrado»), salvo cuando no se cumplían las condiciones estadísticas necesarias para realizar dicha prueba, en cuyo caso se usó el test exacto de Fisher. De igual modo, se estudió la distribución de TB pulmonar y extrapulmonar entre

las diferentes familias. Se consideró significativo todo valor de $p < 0.05$. Los datos se procesaron con el programa SPSS versión 18.

RESULTADOS

Se analizaron 445 casos con cultivo positivo, de los cuales cinco (1.1 %) se consideraron falsos positivos por contaminación cruzada en el laboratorio. El caso más llamativo fue el de un paciente con dos aislamientos (la fecha del primero fue mayo de 2009 y la del segundo octubre de 2010) en los que se identificaron dos genotipos muy diferentes: NSIT17/M15Ex068 en el de 2009 y SIT50/M15Ex151 en el de 2010. Durante el estudio de la historia clínica se observó que en el segundo caso solo existía un cultivo positivo. Este paciente padecía leucemia aguda mieloblástica, por lo que en su momento el equipo médico consideró que la inmunodeficiencia pudo favorecer la reactivación del anterior episodio de TB. Se comprobó que el aislado de 2010 presentaba un genotipo idéntico al de una muestra procesada el mismo día; sin embargo, entre ambos pacientes no se encontró ninguna relación epidemiológica. Con la ayuda de las técnicas moleculares se pudo concluir que el aislamiento de 2010 se correspondía con un caso de contaminación cruzada en el laboratorio, y por consiguiente, el segundo tratamiento que recibió este paciente fue innecesario.

De los 440 casos restantes, en 431 (97.95 %) se identificó a *M. tuberculosis*, en ocho (1.82 %) a *M. bovis* y en uno (0.23 %) a *M. africanum*. Los casos de *M. bovis* no se incluyeron en el análisis de los datos, ya que se analizarán en otra parte del trabajo. Al comparar el espoligotipo (76000007777671) del único aislado de *M. africanum* de nuestro estudio con la base de datos internacional SITVITWEB (Demay *et al.*, 2012), se observó que solo existía un aislamiento (ORPHAN) con ese mismo espoligotipo, y Guinea Bissau era el país de origen de ambos pacientes. Todos los resultados del

análisis molecular, así como otros datos de interés, se pueden consultar en la [tabla S1](#) del material suplementario aportado en formato digital.

En el análisis univariante de los datos se comprobó que el 71.3 % (n = 308) de los casos correspondieron a hombres y el 28.7 % (n = 124) a mujeres; por lo tanto, en la población de estudio, por cada mujer con TB había afectados 2.46 hombres. La edad media de los enfermos fue de 48.39 años (Desviación típica = 21.75), con un rango de 92 años (mínimo = 1 y máximo = 93). Por grupos de edad, predominó el de 31 a 65 años (210 / 48.6 %), seguido del grupo de mayores de 65 años (114 / 26.4 %) y del grupo de 16 a 30 años (94 / 21.8 %); los otros 14 (3.2 %) casos se incluyeron en el grupo de hasta 15 años. En cuanto al origen de los pacientes, un 93.3 % (n = 403) de los casos pertenecía a población autóctona y un 6.7 % (n = 29) a inmigrantes; en la figura 23 se puede observar la distribución de casos de pacientes extranjeros por país de origen. El 45.1 % (n = 195) de los enfermos residían en una ciudad con más de 20000 habitantes o en poblaciones de alrededor, mientras que el 54.9 % (n = 237) vivían en pueblos. En el análisis por factores de riesgo para la TB se comprobó que el 12.5 % (n = 54) de los pacientes presentaba también otra enfermedad respiratoria (silicosis, EPOC, etc.), el 7.6 % (n = 33) estaba infectado por el VIH, un 5.8 % (n = 25) padecía cáncer, un 7.6 % (n = 33) diabetes y un 11.1 % (n = 48) otra alteración de la salud. Respecto al consumo de tabaco, alcohol y otras drogas, en el 56.5 % (n = 244) de los casos la historia clínica recogía la condición de fumador del paciente y en un 8.8 % (n = 38) de casos se pudo establecer la situación de alcoholismo; por su parte, en el 7.9 % (n = 34) se especificaba el hábito del paciente a las drogas por vía parenteral y en el 6.5 % (n = 28) se hacía referencia al consumo de drogas por vía no parenteral. En relación a la localización anatómica de la enfermedad, 356 (82.4 %) enfermos presentaban TB pulmonar, 68 (15.74 %) extrapulmonar y en ocho (1.85 %) casos la

localización fue mixta. Según la información contenida en la historia clínica, 28 (6.5 %) pacientes referían haber padecido TB previamente, y 46 (10.6 %) habían contactado con familiares, amigos o conocidos diagnosticados de TB. Por último, el resultado de la prueba de la tuberculina fue positivo en 150 (34.7 %) casos, si bien no se encontró ninguna referencia a esta prueba en más de la mitad (268 / 62 %) de los casos.

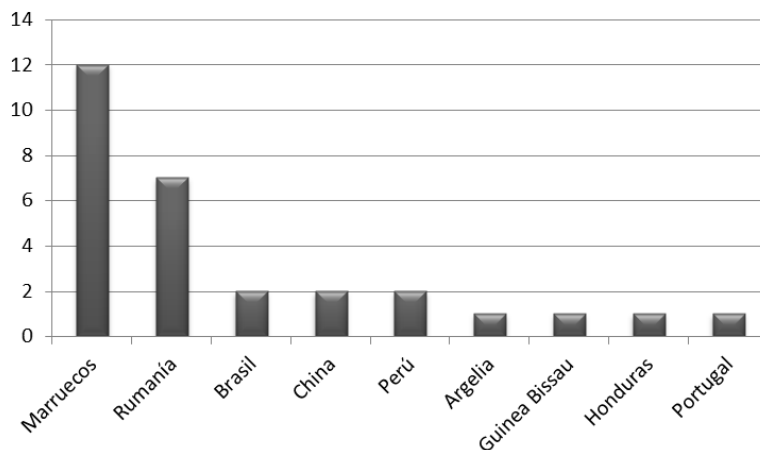


Figura 23: Distribución de casos de pacientes extranjeros por país de origen.

De los 432 aislados incluidos en el análisis, 259 (59.9 %) se encontraban agrupados en 62 clústeres y 173 (40.1 %) se correspondieron con genotipos únicos (ver figura S2 en material suplementario digital). El tamaño de los grupos varió entre dos y 21 aislados; los clústeres de dos fueron los más numerosos (25; 40.3 %), seguidos de los de tres (13; 20.1 %) y de los de cinco (7; 11.3 %). La proporción de casos de TB agrupados no difería sustancialmente por año de aislamiento (tabla 15). De los 62 clústeres identificados, 57 estaban formados en su totalidad por autóctonos, dos (C40 y C61) estaban integrados exclusivamente por pacientes extranjeros y tres (C05, C45 y C55) fueron clústeres mixtos. En estos últimos, existía un único inmigrante por grupo, el resto eran autóctonos. De los tres clústeres mixtos, tan solo en el C55 el caso índice se correspondió con un paciente extranjero.

Año	Todos los casos (% sobre el total de años)	Casos agrupados (% con respecto al año)	Casos únicos (% con respecto al año)
1998	37 (8.6)	19 (51.3)	18 (48.7)
1999	34 (7.9)	23 (67.6)	11 (32.4)
2000	42 (9.7)	25 (59.5)	17 (40.5)
2001	33 (7.7)	20 (60.6)	13 (39.4)
2002	25 (5.8)	18 (72.0)	7 (28.0)
2003	30 (6.9)	20 (66.7)	10 (33.3)
2004	32 (7.4)	25 (78.1)	7 (21.9)
2005	26 (6.0)	13 (50.0)	13 (50.0)
2006	21 (4.9)	13 (61.9)	8 (38.1)
2007	27 (6.2)	17 (63.0)	10 (37.0)
2008	25 (5.8)	17 (68.0)	8 (32.0)
2009	34 (7.9)	18 (52.9)	16 (47.1)
2010	27 (6.2)	16 (59.2)	11 (40.7)
2011	25 (5.8)	8 (32.0)	17 (68.0)
2012	14 (3.2)	7 (50.0)	7 (50.0)
1998-2012	432 (100)	259 (59.9)	173 (40.1)

Tabla 15: Número de casos agrupados y no agrupados por año de aislamiento.

Asimismo, se realizó una comparación de los casos agrupados frente a los no agrupados para diversas variables. Este análisis bivariante mostró que los factores de riesgo asociados a la formación de clústeres fueron: la edad, el origen de los pacientes y la localización anatómica de la enfermedad. Los individuos con menos de 30 años presentaron mayor riesgo de formar agrupaciones (OR = 3.24 / IC del 95 % [1.95-5.40]) que los enfermos con una edad igual o superior a 30 años. En cuanto al origen de los pacientes, los autóctonos tuvieron 4.33 veces más posibilidades de asociarse a clústeres, en comparación con los extranjeros (OR = 4.33 / IC del 95 % [1.87-10.03]). Por último, los pacientes que presentaron una TB pulmonar tuvieron 2.48 veces más riesgo de formar agrupaciones que los enfermos con TB extrapulmonar (OR = 2.48 / IC del 95 % [1.46-4.21]). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre casos agrupados y no agrupados en el resto de variables estudiadas (tabla 16). En el análisis de la distribución de casos agrupados y casos únicos entre las diferentes familias de cepas, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las familias H y T. De este modo, el porcentaje de casos agrupados con cepas de la familia H fue significativamente mayor que el porcentaje de casos agrupados encontrado para el resto de familias,

mientras que el porcentaje de casos únicos con cepas de la familia T fue significativamente mayor que el porcentaje encontrado para el resto de familias (tabla 17). De igual forma, en el estudio de la distribución de casos con localización pulmonar y extrapulmonar entre las diferentes familias, también se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las familias H y T. Así, con respecto al resto de familias, mientras que en los casos con cepas de la familia H fue más frecuente la localización pulmonar, en los casos con cepas de la familia T fue más común la localización extrapulmonar (tabla 18).

Variable	Casos agrupados (%)	Casos únicos (%)	OR	IC del 95 %
Sexo			0.94	(0.61-1.43)
Mujer*	73 (28.2)	51 (29.5)		
Hombre	186 (71.8)	122 (70.5)		
Edad			3.24	(1.95-5.40)
< 30 años*	86 (33.2)	23 (13.3)		
≥ 30 años	173 (66.8)	150 (86.7)		
Lugar de residencia			1.32	(0.89-1.95)
Urbano/periurbano*	124 (47.9)	71 (41.0)		
Rural	135 (52.1)	102 (59.0)		
Origen			4.33	(1.87-10.03)
Autóctono*	251 (96.9)	152 (87.9)		
Extranjero	8 (3.1)	21 (12.1)		
Infección por VIH			0.69	(0.34-1.40)
Sí*	17 (6.6)	16 (9.3)		
No	242 (93.4)	157 (90.7)		
Cáncer			0.84	(0.37-1.90)
Sí*	14 (5.4)	11 (6.4)		
No	245 (94.6)	162 (93.6)		
Diabetes			0.69	(0.34-1.40)
Sí*	17 (6.6)	16 (9.3)		
No	242 (93.4)	157 (90.7)		
Consumo de tabaco			1.25	(0.85-1.84)
Sí*	152 (58.7)	91 (52.6)		
No	107 (41.3)	82 (47.4)		
Abuso de alcohol			1.50	(0.73-3.05)
Sí*	25 (9.7)	13 (7.5)		
No	234 (90.3)	160 (92.5)		
CDVP			0.83	(0.41-1.69)
Sí*	19 (7.3)	16 (9.3)		
No	240 (92.7)	157 (90.7)		
Localización TB ^a			2.48	(1.46-4.21)
Pulmonar*	229 (89.1)	127 (76.0)		
Extrapulmonar	28 (10.9)	40 (24.0)		

Tabla 16: Análisis bivariante de las principales variables sociodemográficas y clínicas asociadas con casos agrupados en Extremadura. * Categoría de referencia. ^aLos casos con localización mixta no se tuvieron en cuenta.

Familia <i>M. tuberculosis</i>	Todos los casos (%*)	Casos agrupados (%**)	Casos únicos (%**)	χ^2	p
AFRI1	1 (0.23)	0 (0.0)	1 (100)	n/a	n/a
Beijing	3 (0.69)	2 (66.7)	1 (33.3)		1.000 ^a
H37Rv	4 (0.92)	4 (100)	0 (0.0)	n/a	n/a
LAM	126 (29.16)	71 (56.3)	55 (43.7)	0.62	0.430
T	104 (24.07)	52 (50.0)	52 (50.0)	5.65	0.017
H	101 (23.37)	72 (71.3)	29 (28.7)	7.89	0.005
S	6 (1.38)	2 (33.3)	4 (66.7)		0.230 ^a
X	6 (1.38)	5 (83.3)	1 (16.7)		0.408 ^a

Tabla 17: Número de casos de TB con genotipos compartidos y únicos distribuidos por familia.

n/a = no se realizó ninguna prueba estadística debido a que existía alguna celda en la fila con valor 0.

^a Se utilizó el estadístico exacto de Fisher.

* % con respecto al total de casos (n = 432). ** % con respecto al número de casos dentro de cada familia.

Familia <i>M. tuberculosis</i>	Todos los casos (%*)	TB pulmonar (%**)	TB extrapulmonar (%**)	χ^2	p
AFRI1	1 (0.23)	0 (0.0)	1 (100)	n/a	n/a
Beijing	3 (0.69)	3 (100)	0 (0.0)	n/a	n/a
H37Rv	4 (0.92)	4 (100)	0 (0.0)	n/a	n/a
LAM	126 (29.16)	106 (84.1)	20 (15.9)	0.002	0.961
T	104 (24.07)	80 (76.9)	24 (23.1)	5.55	0.018
H	101 (23.37)	92 (91.1)	9 (8.9)	4.63	0.031
S	6 (1.38)	5 (83.3)	1 (16.7)		1.000 ^a
X	6 (1.38)	5 (83.3)	1 (14.7)		1.000 ^a

Tabla 18: Número de casos de TB pulmonar y extrapulmonar distribuidos por familia.

n/a = no se realizó ninguna prueba estadística debido a que existía alguna celda en la fila con valor 0.

^a Se utilizó el estadístico exacto de Fisher.

* % con respecto al total de casos (n = 432). ** % con respecto al número de casos dentro de cada familia.

Tras considerar un caso índice en cada clúster, se estimó que el 45.6 % (259-62/432) de los casos analizados se debían a una transmisión reciente. En el análisis llevado a cabo para establecer relaciones epidemiológicas en los clústeres identificados se halló algún tipo de vínculo en el 76.1 % (n = 197) de los casos agrupados. En el 22.4 % (n = 58) de los casos agrupados se encontraron vínculos evidentes (no se tuvieron en cuenta los casos de recidivas). No se pudo identificar ninguna conexión epidemiológica en el 23.9 % (n = 62) de los casos agrupados (tabla 19).

Clúster	Nº de casos	Nº de casos relacionados	Tipo de vínculo epidemiológico
C01	2	0	Desconocido
C02	3	3	Evidente (contactos sociales: comparten prácticas de riesgo [CDVP])
C03	5	2	Posible
C04	2	0	Desconocido
C05	4	2	Posible
C06	2	2	Posible
C07	2	0	Desconocido
C08	3	2	Evidente (familiares no convivientes)
C09	3	0	Desconocido
C10	3	2	Recidiva (mismo paciente)
C11	2	2	Posible
C12	9	8	Posible
C13	3	3	Posible
C14	2	0	Desconocido
C15	7	4	Posible
C16	3	2	Posible
C17	4	4	Evidente (contactos sociales)
C18	2	0	Desconocido
C19	5	5	Evidente (familiares: padre y dos hijos) en tres casos; posible con y entre el resto
C20	2	0	Desconocido
C21	2	2	Posible
C22	5	5	Posible
C23	3	2	Recidiva (mismo paciente)
C24	2	2	Posible
C25	2	2	Recidiva (mismo paciente)
C26	2	2	Posible
C27	3	0	Desconocido
C28	4	3	Evidente (familiares: padre e hijo) en dos casos; posible con el otro
C29	4	4	Posible
C30	2	2	Evidente (familiares: padre e hijo)
C31	7	7	Posible
C32	3	3	Posible
C33	2	2	Evidente (familiares: hermanos)
C34	2	2	Posible
C35	2	2	Posible
C36	5	4	Posible
C37	3	3	Evidente (familiares: hermanos) en dos casos; posible con el otro
C38	3	3	Posible
C39	2	2	Posible
C40	3	3	Recidiva (tres casos de un mismo paciente)
C41	4	4	Posible
C42	13	13	Evidente (familiares: matrimonio e hijo) en tres casos; posible con y entre el resto
C43	5	0	Desconocido
C44	2	2	Posible
C45	13	9	Evidente (familiares o contactos sociales) en seis casos; posible con y entre el resto
C46	3	2	Evidente (contactos sociales: comparten prácticas de riesgo [CDVP])
C47	14	14	Evidente (familiares o contactos sociales) en siete casos; posible con y entre el resto
C48	4	2	Evidente (familiares: madre e hija)
C49	5	5	Posible
C50	2	2	Evidente (familiares: padre e hijo)

Tabla 19: Relación epidemiológica entre los casos agrupados en clústeres.

Continúa en la siguiente página

Clúster	Nº de casos	Nº de casos relacionados	Tipo de vínculo epidemiológico
C51	6	5	Evidente (familiares: padre e hija) en dos casos; posible con y entre el resto
C52	2	0	Desconocido
C53	2	2	Posible
C54	2	2	Evidente (familiares: madre e hija)
C55	21	21	Evidente (familiares o contactos sociales) en seis casos; posible con y entre el resto
C56	2	0	Desconocido
C57	8	5	Posible
C58	7	2	Posible
C59	6	4	Recidiva (dos casos de un mismo paciente); posible con y entre el resto
C60	2	0	Desconocido
C61	2	2	Evidente (contactos sociales)
C62	5	5	Evidente (familiares: padres e hijos) en cuatro casos; posible con el resto

Tabla 19: Relación epidemiológica entre los casos agrupados en clústeres (continuación).

En este análisis se observaron seis casos de recidivas (TB recurrente causada por la misma cepa): cuatro pacientes desarrollaron nuevamente la enfermedad entre uno y cuatro años después del primer episodio, mientras que otro paciente (un recluso nacido en Marruecos) sufrió tres episodios de TB con un intervalo de poco más de un año entre cada uno de ellos. Por otra parte, se detectaron tres posibles eventos de transmisión entre pacientes con vínculos epidemiológicos evidentes, cuyos aislados mostraron una variación en un solo *locus* del perfil MLVA (Allix-Béguec *et al.*, 2014; Jonsson *et al.*, 2014). Dos de estos eventos se hallaron en una misma familia: un paciente en el que se identificó el perfil M15Ex108 era hermano de otro enfermo que presentó el perfil único M15Ex110 (una variación entre ambos perfiles); a su vez, el primer paciente también era familiar directo (marido y padre, respectivamente) de una mujer y su hija en las que se encontró el perfil M15Ex109 (una variación con respecto a M15Ex108), si bien, cuando al padre se le diagnosticó la TB (enero de 1999) su hija aún no había nacido, por tanto, todo hace indicar que fue la madre la que le transmitió la enfermedad a la niña. Curiosamente, una niña de cinco años, integrante del mismo grupo que la mujer y su hija del anterior caso, también presentó el perfil M15Ex109, aunque es poco probable que el foco de infección pudiera ser alguno de los miembros de su grupo (C48), sino

que seguramente fue su padre, al que se le diagnosticó la enfermedad poco antes que a ella y en el que se identificó el perfil M15Ex108, quien le transmitió la infección. Al mismo tiempo, se detectaron otras posibles situaciones de transmisión reciente inicialmente no contempladas, como la observada en un grupo de nueve aislados (clústeres C30 y C31) resistentes a la isoniacida con idéntico perfil MLVA (M15Ex163) pero distinto espoligotipo (SIT47 o SIT50), que pertenecían a pacientes de la misma localidad. También existía una posible relación epidemiológica entre el paciente con el genotipo NSIT06/M15Ex089 y varios enfermos con el genotipo SIT33/M15Ex089, ambos también resistentes a la isoniacida.

DISCUSIÓN

En este estudio se han analizado los factores sociodemográficos, clínicos y epidemiológicos asociados con la formación de grupos de cepas de *M. tuberculosis* idénticas, o genéticamente relacionadas, cuyo origen parece estar en la transmisión reciente de la enfermedad (Rodwell *et al.*, 2012). De los 432 casos de TB estudiados desde 1998 hasta 2012 en Extremadura, la mayoría (59.9 %) presentaba genotipos compartidos por dos o más aislados. El porcentaje de aislados agrupados (59.9 %) en nuestro estudio es algo superior al encontrado en otros trabajos españoles: 52.6 % en Zaragoza (López-Calleja *et al.*, 2007), 52.4 % en Elche (Ruiz García *et al.*, 2002), 50.7 % en Madrid (Cacho Calvo *et al.*, 2005), 46 % en Barcelona (Solsona *et al.*, 2001), 44 % en Almería (Lucerna *et al.*, 2011) o 38 % en Sevilla (Safi *et al.*, 1997); sin embargo, es inferior al 72.3 % observado en un estudio en Gran Canaria (Pena *et al.*, 2003). Exceptuando el trabajo insular, esto podría estar relacionado con la duración de la investigación, ya que la proporción de casos agrupados aumenta cuanto mayor es el período de estudio (Glynn *et al.*, 2005; Houben y Glynn, 2009), y el nuestro fue el que

más años abarcó. Además, en este trabajo hemos empleado el MLVA (junto con el espoligotipado) para la caracterización molecular de los aislados, mientras que en el resto de estudios se utilizó el análisis del RFLP (en algunos casos complementado con el espoligotipado), lo que podría suponer una discrepancia en el establecimiento de agrupaciones entre ambos métodos (Hanekom *et al.*, 2008). Esto sugiere que el diseño del estudio y el método de genotipado utilizado, así como el escenario en el que se desarrolla la investigación, podrían afectar a la proporción de casos agrupados (Mears *et al.*, 2015).

Aun asumiendo que el caso índice de cada clúster fue consecuencia de una reactivación endógena, nuestros resultados indicarían que una parte importante ($\approx 45\%$) de los casos de TB en nuestra región probablemente se debieron a una transmisión reciente. No obstante, el hecho de encontrar genotipos compartidos no refleja necesariamente una transmisión reciente (Glynn *et al.*, 1999a), ya que existen otros factores que pueden dar lugar a la aparición de genotipos idénticos, como la reactivación simultánea de infecciones adquiridas hace mucho tiempo (Smit *et al.*, 2014), la homoplasia (Reyes *et al.*, 2012) o el predominio regional de un genotipo que se ha difundido a lo largo de muchos años (García-Pachón y Rodríguez, 2005). En nuestro estudio hemos encontrado que los grupos compuestos por dos o tres casos representaron algo más del 50 % del total de clústeres, lo cual indica que la mayor parte de los casos de TB en Extremadura se están produciendo en pequeños brotes o microepidemias causados por cepas diversas; esto refleja la ausencia de un genotipo de *M. tuberculosis* predominante en la población (Samper *et al.*, 1998), y sugiere que los programas de control de la enfermedad estarían siendo eficaces (Alonso Rodríguez *et al.*, 2010). A su vez, con el uso combinado del espoligotipado y el MLVA 15 *loci*

también parece improbable que la homoplasia haya tenido una influencia notable en nuestros resultados (Reyes *et al.*, 2012).

Por otro lado, el 40.1 % de los casos de este estudio presentaron genotipos únicos. Los casos con genotipo no compartido normalmente se atribuyen a la reactivación de la infección latente; sin embargo, esto tampoco se cumple en todos los casos, ya que existe la posibilidad de que se haya producido la mutación de un genotipo transmitido recientemente o también puede suceder que la persona que transmitió un genotipo aparentemente único no haya sido incluida en el análisis. La probabilidad de interpretar de forma errónea un caso con genotipo único como una reactivación endógena aumenta cuantos menos casos se analizan y cuanto menor es la duración del estudio (Glynn *et al.*, 1999b; Murray y Alland, 2002).

Uno de los puntos fuertes de nuestra investigación ha sido precisamente su duración. El hecho de disponer de un período de estudio de 14 años y cinco meses nos ha permitido analizar determinados aspectos relacionados con la epidemiología y la patogénesis de la enfermedad que de otra forma hubiera resultado imposible. De este modo, aunque no podemos descartar que se haya producido un contagio a partir de individuos que no han sido incluidos en el estudio, hemos observado que el tiempo transcurrido entre la detección de algunos casos y la aparición de otros con los que comparten cepas y vínculos epidemiológicos fue superior a cinco años; tiempo límite establecido para separar una transmisión reciente de una remota, aunque este es un plazo arbitrario (Borgdorff *et al.*, 2005). Así, por ejemplo, en un clúster (C33) formado por dos casos con un genotipo muy particular (ORPHAN03/M15Ex165), se comprobó que los pacientes eran hermanos, y entre un aislamiento y otro había transcurrido una período de algo más de ocho años. En otro grupo (C31), compuesto por siete pacientes que residían en la misma localidad, también pasaron ocho años sin que apareciese la

cepa (SIT50/M15Ex163) resistente a la isoniacida causante de la microepidemia. En concreto, entre abril de 1998 y noviembre de 2001 se identificaron cinco aislados con ese genotipo, y no fue hasta noviembre de 2009 cuando volvió a aislarse en otro paciente la cepa en cuestión; la cual reapareció nuevamente en mayo de 2012, lo que sugiere que el período de incubación pudo ser incluso superior a los ocho años si el enfermo diagnosticado en 2009 no fue quien contagió al paciente que enfermó en 2012.

Estas observaciones confirman, una vez más (Lillebaek *et al.*, 2002), que la fase de latencia de la TB puede prolongarse durante años. Además, corroboran que debe replantearse la forma en que se estima la proporción de TB atribuible a la transmisión reciente, puesto que difícilmente se puede hablar de infección recién adquirida cuando han transcurrido ocho años desde el diagnóstico de la enfermedad en un paciente y la detección de la misma cepa en otro enfermo con el que tiene vínculos epidemiológicos evidentes. Varios autores han discutido sobre esta cuestión con anterioridad (Glynn *et al.*, 1999a; Murray, 2002; Tanaka y Francis, 2005; Benedetti *et al.*, 2010), y coinciden en que los casos agrupados deben interpretarse con precaución para estimar la verdadera proporción de TB atribuible a la transmisión reciente. En este sentido, consideramos que sería oportuno descartar los casos recurrentes causados por la misma cepa, ya que, cuando menos en regiones de baja incidencia de TB como Extremadura, casi con total seguridad son consecuencia de la reactivación de un episodio previo de TB y no de una reinfección exógena. En cambio, se debería contemplar la posibilidad de que se haya producido una transmisión reciente cuando se observa una diferencia mínima en el perfil genotípico de dos casos relacionados.

El enfoque utilizado para identificar la proporción de TB atribuible a la transmisión reciente se basa en el concepto de que los organismos epidemiológicamente relacionados comparten genotipos indistinguibles, mientras que los organismos no

relacionados presentan alguna diferencia genética (Barnes y Cave, 2003; Moonan *et al.*, 2012). Sin embargo, tanto en este como en otros estudios (Allix-Béguet *et al.*, 2014; Jonsson *et al.*, 2014) se ha podido establecer una clara relación epidemiológica entre aislados con alguna variación en el perfil MLVA. Quizás el caso que mejor representa esta situación en nuestro trabajo es el de dos hermanos con un genotipo similar pero no idéntico: uno de los pacientes presentó un perfil compartido (M15Ex108), mientras que en el otro hermano se identificó un perfil único (M15Ex110); dado que entre ambos perfiles existía una variación en un *locus*, no se consideró como transmisión reciente. Esto indica que, si bien la definición de clúster se debe mantener estricta debido al elevado grado de clonalidad encontrado recientemente en las cepas de *M. tuberculosis* (Sloot *et al.*, 2013), las variaciones de un solo *locus* a veces ocurren entre aislados con enlaces claros (Allix-Béguet *et al.*, 2014). Por lo tanto, siempre que exista una relación epidemiológica entre los pacientes, parece razonable contemplar la posibilidad de transmisión reciente en aquellos casos en los que se observe una variación en un solo *locus* del perfil MLVA (Jonsson *et al.*, 2014); obviamente, deben presentar el mismo espoligotipo. De igual modo, creemos que este razonamiento puede ser extensible a otros casos, como el de los nueve aislados clínicos resistentes a la isoniacida con el mismo perfil MLVA (M15Ex163) pero distinto espoligotipo (SIT47 o SIT50), que procedían de pacientes que residían en la misma localidad. La evidencia de una conexión epidemiológica entre ambos grupos (C30 y C31) señalaría a un evento de microevolución en el *locus* DR (Aga *et al.*, 2006) como causa de la aparición de un nuevo genotipo (SIT47/M15Ex163), que tendría su origen en una cepa (SIT50/M15Ex163) transmitida entre vecinos. Este argumento se vería reforzado por el hecho de que la única transmisión del genotipo SIT47/M15Ex163 se haya producido entre un padre (caso índice) y su hijo de tres años. La existencia de una relación

epidemiológica apoya, por tanto, el escenario evolutivo planteado en el apartado 12, al tiempo que resta verosimilitud a la posibilidad de que las mismas mutaciones de resistencia se adquirieran de forma independiente. Por otro lado, la evidencia de vínculos epidemiológicos entre los pacientes con determinadas cepas resistentes a los antibióticos demuestra que se ha producido una transmisión de esas cepas entre la población extremeña, algo que ya se había evidenciado en España (Samper *et al.*, 2005; Gavín *et al.*, 2012) o Portugal (Perdigão *et al.*, 2008; Perdigão *et al.*, 2011), y descarta que en la mayoría de los casos la aparición de resistencia a los fármacos haya tenido lugar durante el tratamiento, como en México (Martinez-Guarneros *et al.*, 2013).

En el análisis por factores de riesgo asociados a la formación de clústeres, observamos que los pacientes con una edad inferior a 30 años, los autóctonos y los enfermos con TB pulmonar tenían mayor probabilidad de pertenecer a un clúster. Alguno de estos factores de riesgo detectados ya se habían sugerido en trabajos previos realizados en nuestro país (Iñigo Martínez *et al.*, 2000; Elizaga *et al.*, 2002; Ruiz García *et al.*, 2002; Pena *et al.*, 2003; Cacho Calvo *et al.*, 2005; Iñigo *et al.*, 2007; López-Calleja *et al.*, 2007; Lucerna *et al.*, 2011). En el caso de la edad se observa una gran disparidad en cuanto al criterio utilizado para establecer las distintas categorías; si bien, la mayoría de los trabajos coinciden en que la transmisión reciente suele estar asociada a la población más joven (Nava-Aguilera *et al.*, 2009). Esto podría deberse a la mayor actividad social que presenta este grupo poblacional (contactos en centros educativos, lugares de trabajo, de ocio, transportes públicos, etc.) con respecto a personas de más edad. Coincidiendo también con otros trabajos (de Bruyn *et al.*, 2001; Weis *et al.*, 2002; Heldal *et al.*, 2003), se ha observado una mayor probabilidad de pertenecer a clústeres en autóctonos que en extranjeros. Estos resultados sugieren que los inmigrantes desarrollan la enfermedad principalmente por reactivación de una infección adquirida en

su país de origen. Además, la escasa presencia de clústeres mixtos en nuestro estudio descarta que exista una importante transmisión bidireccional entre la población autóctona y la inmigrante. En tan solo uno (C55) de los tres clústeres mixtos detectados, el caso índice se correspondió con un paciente extranjero. Este caso es el de un paciente nacido en Brasil, del que se sospechaba que pudiera haber importado el espoligotipo SIT106 a nuestra región (Apartado 10). Después de recopilar más información, consideramos que ese espoligotipo ya existía en Extremadura, puesto que hay otro grupo de aislados (C58) con ese mismo espoligotipo aunque con diferente perfil MLVA (M15Ex082). Sin embargo, es posible que el paciente brasileño importase un genotipo (SIT106/M15Ex069) distinto al existente en nuestra región hasta su llegada (SIT106/M15Ex082), y la introducción de una cepa nueva justificaría que ese clúster (C55) sea el de mayor tamaño (21 casos) de todo el estudio.

Por otra parte, se encontró que las cepas de la familia H fueron más comunes entre los casos agrupados, mientras que las cepas de la familia T lo eran en los casos no agrupados. Una situación análoga se observó en el estudio de la distribución de casos con localización pulmonar y extrapulmonar entre las diferentes familias. Estos resultados apoyarían la idea extendida en los últimos años de que la diversidad genotípica de *M. tuberculosis* podría tener implicaciones clínicas (Coscolla y Gagneux, 2010; Click *et al.*, 2012; Wamala *et al.*, 2014).

No obstante, tanto esta como otras suposiciones son difíciles de probar debido a las limitaciones de nuestra investigación. Una de ellas es el carácter regional del trabajo, no pudiéndose descartar que algún paciente haya adquirido la TB por contacto con personas que residen fuera del área estudiada. Además, nuestra investigación también está limitada por su diseño retrospectivo, por lo que es posible que los resultados puedan estar parcialmente condicionados y sesgados debido a la falta de información en

las historias clínicas. Esta puede ser una de las razones del bajo porcentaje (22.5 %) de casos agrupados con vínculos epidemiológicos evidentes. Aunque se debe ser precavido a la hora de hacer comparaciones con otros trabajos, ya que las definiciones de vínculos epidemiológicos varían en los diferentes estudios, diversas investigaciones, tanto en España como en otros países, han conseguido un mayor porcentaje de confirmación epidemiológica a través de entrevistas con los pacientes (Diel *et al.*, 2002; Weis *et al.*, 2002; van Deutekom *et al.*, 2004; Martínez-Lirola *et al.*, 2008; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2009a; Barniol *et al.*, 2009; Perri *et al.*, 2011).

Este trabajo también nos ha permitido detectar casos con cultivos falsos positivos. Además de influir en los resultados de los estudios epidemiológicos (Martínez *et al.*, 2006), la existencia de cultivos falsos positivos puede inducir al diagnóstico erróneo de TB y la instauración de tratamientos prolongados con fármacos potencialmente tóxicos (Alonso *et al.*, 2007). En esta investigación, se determinó que el 1.1 % ($n = 5$) del total de casos de TB humana con cultivo positivo analizados ($n = 445$) se debía a una contaminación cruzada en el laboratorio. A pesar de que no es un dato alarmante y entra dentro de un rango (1-3 %) que se podría considerar como tolerable a tenor de lo publicado en otros estudios (Small *et al.*, 1993; Burman y Reves, 2000; de Boer *et al.*, 2002; Ruddy *et al.*, 2002), estos casos se hubiesen podido detectar a tiempo si en los hospitales extremeños, o cuando menos en un centro de referencia, se aplicasen de forma rutinaria técnicas como el MLVA en el diagnóstico de la TB (Martín *et al.*, 2008). Asimismo, debemos señalar que los casos de contaminación cruzada han podido afectar ligeramente a los resultados obtenidos en análisis previos (Apartado 10, 11 y 12). Esta circunstancia se debe asumir cuando el análisis genotípico no se puede completar con la oportuna información clínica y epidemiológica. Por lo tanto, para que la caracterización molecular de los aislados clínicos sea una medida realmente útil en

los hospitales extremeños, es fundamental que exista una buena comunicación entre todas las partes implicadas en el diagnóstico de la TB.

En conclusión, nuestros resultados mostraron que una parte importante de los casos de TB en Extremadura podría ser atribuida a la transmisión reciente; esto implica la necesidad de intensificar las medidas de búsqueda activa de casos entre los contactos de pacientes con TB, especialmente en autóctonos de menos de 30 años, grupo poblacional que parece contribuir activamente a la transmisión de la enfermedad. Al mismo tiempo, consideramos que los estudios clásicos de contactos se deberían completar con una investigación epidemiológica más amplia en la que también se incluyese el análisis molecular de los aislados clínicos, mediante técnicas de genotipado como el MLVA, para poder descubrir escenarios de transmisión menos convencionales que podrían estar pasando inadvertidos. Esto también permitiría detectar a tiempo posibles casos con cultivos falsos positivos por contaminación cruzada en el laboratorio. Además, teniendo en cuenta que la reactivación endógena de la infección latente podría ser la causa de más de la mitad de los casos nuevos de TB en nuestra región, y que dicha reactivación puede ocurrir hasta pasados ocho años desde el contagio, los programas de lucha y control de la TB deberán centrar sus esfuerzos a medio y largo plazo en la aplicación de medidas para prevenir que la enfermedad se desarrolle.

14. Complejidad clonal en la infección por *Mycobacterium tuberculosis*

RESUMEN

La epidemiología molecular ha revelado que la infección por *M. tuberculosis* es más compleja de lo que inicialmente se creía. Nuestro objetivo fue determinar la frecuencia de la complejidad clonal en la infección por *M. tuberculosis* en una población no seleccionada y en un entorno de baja incidencia de TB como Extremadura. En el 1.8 % (n = 8) de los 432 aislados clínicos analizados se detectó más de un alelo en algún *locus* VNTR. Nuestros resultados demuestran que la complejidad clonal en la infección por *M. tuberculosis* también puede ser identificada en entornos de baja incidencia de la enfermedad. Aun así, las infecciones mixtas, los casos de TB recurrente por reinfección exógena y de heterorresistencia son poco comunes en Extremadura.

ABSTRACT

Molecular epidemiologic results have shown that infection with *M. tuberculosis* is more complex than previously thought. The main objective of our study was to characterize the clonal complexity in TB from an unselected low-incidence population as Extremadura. In 1.8 % (n = 8) of the 432 clinical isolates analyzed more than one allele was found in some of the VNTR. Our results showed that the clonal complexity of *M. tuberculosis* infection can also be identified in geographical areas with a low incidence of the disease. Nevertheless, mixed-strain *M. tuberculosis* infections, recurrent TB cases caused by exogenous reinfection and cases of hetero-resistance are rare in Extremadura.

TEXTO

Hasta hace unos años se asumía que un paciente con TB albergaba solo un tipo de cepa; sin embargo, la aplicación de las técnicas de genotipado al análisis de aislados clínicos de *M. tuberculosis* ha revelado que la infección por este agente patógeno podría ser más compleja de lo que inicialmente se creía. De este modo, se han identificado con cierta frecuencia varios fenómenos relacionados con la complejidad clonal, como las infecciones mixtas (revisado recientemente en Cohen *et al.*, 2012) o los fenómenos de microevolución que conducen a la aparición de variantes clonales dentro de un huésped (Warren *et al.*, 2002; Aga *et al.*, 2006; Al-Hajoj *et al.*, 2010; Navarro *et al.*, 2011; Pérez-Lago *et al.*, 2011; Kato-Maeda *et al.*, 2013; Pérez-Lago *et al.*, 2014a). En algunos casos se ha observado que las diferentes cepas o variantes clonales no se distribuyen de forma homogénea, sino que infectan distintas zonas dentro del mismo pulmón o incluso localizaciones anatómicas diferentes, dando lugar a lo que se conoce como compartimentación de la infección (García de Viedma *et al.*, 2003; Kaplan *et al.*, 2003; García de Viedma *et al.*, 2006b; Andrade *et al.*, 2009; Muwonge *et al.*, 2013). Como ocurre con otros aspectos de esta enfermedad, es difícil establecer una clara distinción entre las infecciones mixtas y la diversidad clonal derivada de los fenómenos de microevolución. Algunos autores señalan que la diversidad clonal se relaciona con casos esporádicos de polimorfismo asociados a mutaciones adaptativas, mientras que una infección mixta implica la adquisición de otro genotipo de *M. tuberculosis* completamente nuevo por la exposición simultánea o continuada a diferentes cepas (Cohen *et al.*, 2012; Muwonge *et al.*, 2013).

En España existen varios trabajos que tratan acerca de estas cuestiones (García de Viedma *et al.*, 2003; García de Viedma *et al.*, 2005a; García de Viedma *et al.*, 2006b; Martín *et al.*, 2007; Martín *et al.*, 2010; Martín *et al.*, 2011; Navarro *et al.*, 2011; Pérez-

Lago *et al.*, 2011; Pérez-Lago *et al.*, 2012; Navarro *et al.*, 2013; Pérez-Lago *et al.*, 2014a; Pérez-Lago *et al.*, 2015), aunque se limitan a dos escenarios epidemiológicos (Madrid y Almería) con una incidencia moderada de TB (Navarro *et al.*, 2011).

Por ello, el objetivo de este análisis ha sido determinar la frecuencia de la complejidad clonal en la infección por *M. tuberculosis* en una población no seleccionada y en un entorno de baja incidencia de TB como Extremadura. El estudio de la complejidad clonal se ha basado en los datos obtenidos en un análisis previo (Apartado 13). A diferencia del espoligotipado, que no permite detectar infecciones con múltiples cepas en un paciente (salvo que se analicen por separado varias colonias), debido a que los espaciadores presentes en unos clones pueden ocultar la ausencia de espaciadores en otros, el MLVA es un método simple, rápido y sensible para estudiar la complejidad clonal en la TB (Shamputa *et al.*, 2004; García de Viedma *et al.*, 2005a; Shamputa *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2007). En el análisis con marcadores VNTR solo se obtiene un alelo para cada *locus*, por tanto, la presencia de dos alelos en uno o más *loci* reflejaría la existencia de una infección por dos genotipos diferentes. En el presente trabajo se ha considerado que un paciente padecía una infección mixta cuando había más de un alelo en más de un *locus*, mientras que se asumió la presencia de variantes clonales (infección policlonal) cuando solo era un *locus* el que mostraba más de un alelo (Mulenga *et al.*, 2009; Muwonge *et al.*, 2013).

En el 1.8 % (n = 8) de los 432 aislados clínicos analizados se detectó más de un alelo en algún *locus* VNTR (tabla 20). En todos los casos los pacientes eran nativos, la localización de la TB fue pulmonar y en las historias clínicas de estos enfermos no se encontraron referencias a antecedentes personales o familiares de TB. En tres de los ocho pacientes se identificaron dos alelos en más de un *locus* VNTR; concretamente, en la muestra TBhEx053 se encontraron siete *loci* con dos alelos (fig. 24). Estos resultados

demuestran que en Extremadura las infecciones mixtas, por la exposición simultánea a múltiples cepas o la reinfección exógena con cepas nuevas, son poco comunes. En los otros cinco pacientes solo se observó un *locus* con más de un alelo, por lo que probablemente estos casos se debieron a fenómenos de microevolución. Hay que destacar que dos (TBhEx395 y TBhEx409) de estos cinco casos se agruparon en el mismo clúster (C12) y el *locus* en el que se observó la presencia de dos alelos no fue el mismo en ambos (tabla 20), por tanto, entre algunas variantes clonales de estos pacientes podrían existir diferencias en dos *loci*.

Identificación de la muestra	Nº de repeticiones por <i>locus</i> VNTR														
	424	577	580	802	960	1644	1955	2163b	2165	2401	2996	3192	3690	4052	4156
TBhEx052	1	4	3	2	2-3	3-4	2	3	2	2	4-5	3	6	3	2
TBhEx053	2	3	2-3	1-2	3-5	2-3	2	5	2-3	1-4	5	3	5-6	6	2
TBhEx116	4	4	5	1	2-3	2	3	4	2	1	4	3	5	7.7	2
TBhEx118	2	3	3	3	4	3	3	4	2	2-4	5	2	6	5	3
TBhEx219	2	4	3	4	2	3	2-3	2	2-3	2	5	2	6	1	2
TBhEx340	2	4	3	2	3	4	2-3	3	2	2	6	3	6	5	2
TBhEx395	2	3	3	2	3	3-4	2	4	2	2	5	3	6	5	2
TBhEx409	2	3	3	2	3	4	2	3-4	2	2	5	3	6	5	2

Tabla 20: Aislados de *M. tuberculosis* con dos alelos en algún *locus* VNTR.

En esta investigación también se detectaron varios eventos de microevolución entre pacientes con vínculos epidemiológicos (tabla 21), algo que ya ha sido descrito en nuestro país (Pérez-Lago *et al.*, 2011). El genotipo M15Ex108 parece que evolucionó en dos ocasiones diferentes dentro de una misma familia (eventos A y B); una situación que podría ser equivalente a la expuesta anteriormente en el clúster C12, ya que entre el perfil M15Ex109 y el M15Ex110 existe una variación en dos *loci*. Además, el genotipo M15Ex108 pudo evolucionar en el mismo sentido (M15Ex109) en otra ocasión (evento C). Estos resultados sugieren que algunos clones podrían presentar una mayor frecuencia de mutación y, por consiguiente, una mejor capacidad de adaptación (Rad *et al.*, 2003), lo que concuerda con el hecho de que los clústeres C12 (M15Ex019) y C47

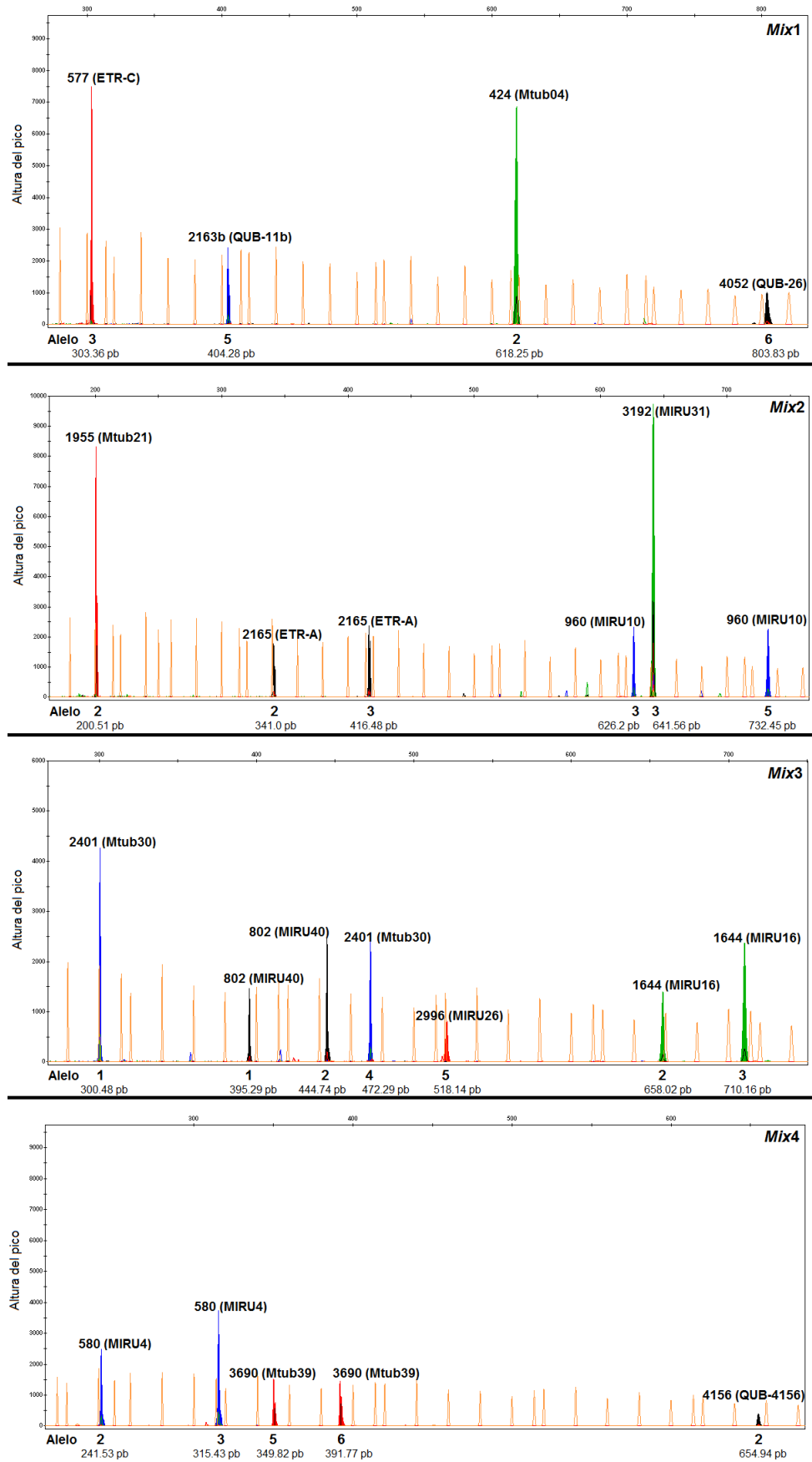


Figura 24: Detección de un caso (TBhEx053) de infección mixta mediante el análisis de los 15 loci VNTR. Los picos de color rojo, azul, verde y negro representan los diferentes amplicones, mientras que los picos naranjas se corresponden con el marcador de pesos moleculares. Para cada amplicón se indica el alelo asignado y su tamaño.

En los eventos D y E se evidenció que a pesar del tiempo transcurrido entre un aislamiento y otro, la diferencia en el perfil MLVA de los genotipos relacionados fue mínima. Estos resultados concuerdan con las observaciones de Colangeli *et al.* (2014) que encontraron una tasa de mutación baja durante la latencia. En la actualidad, el concepto de latencia engloba una gran variedad de estados (Barry III *et al.*, 2009), y es posible que durante la fase de infección activa, en la que hay multiplicación bacteriana en ausencia de manifestaciones clínicas, pueda ocurrir alguna microevolución. Además, la existencia de un gran retraso entre el comienzo de la fase clínica y el diagnóstico de la enfermedad permite a la población bacteriana infectante aumentar de tamaño y proporciona tiempo suficiente para que ocurra la microevolución (Al-Hajoj *et al.*, 2010). El diseño retrospectivo de esta investigación nos impide determinar si existió tal retraso en alguno de los casos en los que se ha detectado complejidad clonal. Tampoco nos permite establecer el grado de compartimentación de la infección por *M. tuberculosis* en nuestra población, puesto que solo se analizó una muestra de cada caso.

Por otro parte, también se estudió la complejidad clonal en casos recurrentes de TB. Tan solo en uno de los cinco pacientes con TB recurrente se halló un perfil MLVA diferente entre un episodio y otro. Se consideró, por tanto, que en los otros cuatro pacientes la recurrencia se debió a una recidiva (Apartado 13). Estos resultados indican que la enfermedad recurrente es poco común en Extremadura y suele deberse a la reactivación endógena de un proceso anterior. De hecho, la presencia del mismo espoligotipo y la existencia de una variación en un solo *locus* entre los dos genotipos de ese paciente apoyarían también esta afirmación, por lo que seguramente estemos ante un nuevo caso de infección policlonal. Aunque la variación entre los genotipos fue mínima, se observó que ambos diferían en su perfil de resistencia frente a la isoniacida. Así, mientras que el aislado de 2005 (TBhEx108) mostró resistencia frente a este antibiótico,

el aislado de 2011 (TBhEx374) fue sensible. Este fenómeno no es raro en *M. tuberculosis*, y son numerosos los estudios que han descrito la presencia de poblaciones policlonales y heteroresistentes en la infección por este agente patógeno (Rinder *et al.*, 2001; Post *et al.*, 2004; Martín *et al.*, 2007; Hofmann-Thiel *et al.*, 2009; Niemann *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012; Eilertson *et al.*, 2014). La posibilidad de que un paciente pueda estar infectado con variantes resistentes y sensibles al mismo tiempo, de las cuales solo una puede ser detectada en las pruebas de sensibilidad antibiótica, tiene importantes implicaciones clínicas y de Salud Pública. Afortunadamente, en nuestra región, esta parece ser una situación anecdótica, lo cual no resta interés al descubrimiento de este tipo de casos, en especial porque, según algunos autores, la heterorresistencia es un fenómeno claramente subestimado (Hofmann-Thiel *et al.*, 2009).

En conclusión, el MLVA nos ha permitido detectar la presencia de diferentes cepas o subclones genéticamente distintos de una determinada cepa en un mismo paciente. Estos resultados demuestran que la complejidad clonal en la infección por *M. tuberculosis* también puede ser identificada en un entorno de baja incidencia de TB como Extremadura. Además, es posible que la proporción de heterogeneidad clonal en nuestra población sea superior a la observada, debido a que solo se ha analizado una muestra por caso y se ha trabajado sobre aislados clínicos cultivados (Martín *et al.*, 2010). Aun así, en nuestra región, los casos de infecciones mixtas, de TB recurrente por reinfección exógena y de heterorresistencia son poco frecuentes.

Parte IV
Análisis molecular de aislados de
Mycobacterium bovis

15. Tuberculosis humana causada por *Mycobacterium bovis* en Extremadura

RESUMEN

En esta investigación llevada a cabo en Extremadura se han identificado ocho aislados de *M. bovis*, incluidos tres *M. bovis* BCG. Los perfiles de espoligotipo observados en esas muestras fueron: SB0120, SB0121, SB0134 y SB0295. Estos perfiles coinciden con los de cepas aisladas tanto en animales domésticos como en animales salvajes que habitan en fincas de Extremadura. La existencia de algunos aislados clínicos de origen humano con el mismo espoligotipo que los aislados animales confirma que las personas que tienen alguna relación profesional con animales infectados con *M. bovis* parecen estarían especialmente expuestos al contagio de esta zoonosis.

ABSTRACT

In this research, conducted in the Spanish region of Extremadura, has been identified eight isolates of *M. bovis*, including three of *M. bovis* BCG. These isolates were differentiated into four spoligotype patterns: SB0120, SB0121, SB0134, and SB0295. These profiles match with *M. bovis* strains isolated from both livestock and wild animals in Extremadura estates. The existence of *M. bovis* clinical isolates of human origin with the same spoligotype pattern as some isolated from animals highlights that people who are in frequent contact with *M. bovis* infected animals seem particularly susceptible to contracting this zoonotic disease.

TEXTO

M. bovis es el principal agente causal de la TB bovina, y probablemente sea el agente zoonótico más importante en la historia de la humanidad. No obstante, en la actualidad, la TB humana causada por *M. bovis* es un proceso poco frecuente, relacionándose con el consumo de leche sin pasteurizar procedente de animales infectados, o productos lácteos elaborados a partir de esta, y el contacto cercano y continuo con ganado infectado; aunque también se ha descrito la transmisión entre personas (Palenque *et al.*, 1998; Robles *et al.*, 2002; LoBue *et al.*, 2004; Samper *et al.*, 2005; Evans *et al.*, 2007; Sunder *et al.*, 2009; Etchehoury *et al.*, 2010). A pesar de que el ganado se considera el principal reservorio animal de *M. bovis* (de la Rúa-Domenech, 2006), la fauna salvaje también pueden contribuir al mantenimiento y la difusión de la TB bovina (Aranaz *et al.*, 2004). En España, se considera que el jabalí es el principal reservorio salvaje (Hermoso de Mendoza *et al.*, 2006; Naranjo *et al.*, 2008), aunque el ciervo, y localmente el gamo (García-Jiménez *et al.*, 2013), también pueden desempeñar un papel importante en la epidemiología de la TB bovina (Gortázar *et al.*, 2005; Hermoso de Mendoza *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2008). Existen muy pocas publicaciones de infecciones zoonóticas directamente atribuibles al contacto con animales salvajes infectados (Pérez-Lago *et al.*, 2014b).

Además de la trascendencia zoonótica, la TB bovina tiene una notable importancia económica, ya que es la enfermedad infecciosa en la que se han invertido más medios y dinero para su control y erradicación en los últimos años (de Benito *et al.*, 2005). En los países desarrollados, los éxitos logrados en el control de la enfermedad en el ganado han contribuido a que la incidencia anual de casos de TB humana por *M. bovis* haya disminuido considerablemente en las últimas décadas (Hlavsa *et al.*, 2008), mientras que la incidencia es mayor en los países donde los recursos son insuficientes

para implantar programas de control de la TB bovina (Ayele *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2013). En la mayoría de los países industrializados los casos de TB por *M. bovis* en el ser humano representan menos del 1 % del total de los casos, aunque puede haber ciertas áreas y poblaciones con una prevalencia mayor: 0.17-0.5 % en el Reino Unido (Stone *et al.*, 2012); 0.5-2 % en Francia (Mignard *et al.*, 2006); 1.4 % en Países Bajos (Majoor *et al.*, 2011); 1.4 % en EE.UU. (Hlavsa *et al.*, 2008); 2.7 en Nueva Zelanda (Baker *et al.*, 2006); 3 % en Irlanda (Ojo *et al.*, 2008). La llegada de inmigrantes procedentes de países donde la afectación del ganado y la ingestión de productos contaminados son frecuentes, ha contribuido a que aumente el número de casos en estos países (Rodwell *et al.*, 2008; Mandal *et al.*, 2011).

En España, varios trabajos han descrito casos en los que el agente causal fue *M. bovis* (Aguirre *et al.*, 1992; Sauret *et al.*, 1992; Roig *et al.*, 1999; Esteban *et al.*, 2005; Remacha *et al.*, 2006; Hervás Castillo *et al.*, 2007; Alfayate *et al.*, 2009; de Juan, 2010). Un estudio realizado con las muestras disponibles en el «Laboratorio Nacional de Referencia de Micobacterias» entre 2004 y 2007 determinó que el 1.9 % de los casos de TB humana estaban causados por *M. bovis* (Rodríguez *et al.*, 2009). Igualmente, se ha demostrado la transmisión de este agente entre personas, resultando de especial interés, por la alta mortalidad, los brotes de TB humana en la década de 1990 causados por una cepa multirresistente de *M. bovis*, que posteriormente ha seguido detectándose de forma esporádica (Blázquez *et al.*, 1997; Guerrero *et al.*, 1997; Samper *et al.*, 1997; Palenque *et al.*, 1998; Cobo *et al.*, 2001; Rivero *et al.*, 2001; Robles *et al.*, 2002; Solano *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2004; Samper *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2006).

En el presente trabajo se hace una descripción de los casos en los que se identificó a *M. bovis* (o *M. bovis* BCG) en un estudio previo (Aparatado 13). Con el fin de determinar las probables vías de transmisión entre las poblaciones animales y el ser

humano, se definió el perfil genético de los aislados mediante la técnica del espoligotipado (Kamerbeek *et al.*, 1997), que se ha convertido en la primera opción para la genotipificación de *M. bovis* debido a su rapidez, reproducibilidad y poder de discriminación (Haddad *et al.*, 2004). Para el análisis de estos perfiles se utilizó la base de datos internacional específica de *M. bovis* (Smith y Upton, 2012).

En ocho aislados clínicos, de un total de 440, se identificó a *M. bovis*, incluyendo tres *M. bovis* BCG. Estos resultados sugieren que la TB humana causada por *M. bovis* es un proceso poco frecuente en Extremadura. Los perfiles de espoligotipo observados fueron: SB0120 (n = 3), SB0121 (n = 3), SB0134 (n = 1) y SB0295 (n = 1). En la tabla S1 (material suplementario aportado en formato digital) se muestran otros datos de interés.

SB0121 y SB0134, por este orden, son los espoligotipos más prevalentes en la fauna española, mientras que SB0295 y SB0120 también se encuentran con bastante frecuencia (Rodríguez *et al.*, 2010). Resultados similares se han observado en una investigación en Extremadura (García-Jiménez, 2013). A su vez, en un estudio llevado a cabo en nuestro país con aislados humanos de *M. bovis* y *M. caprae* (Rodríguez *et al.*, 2009), se observó que los espoligotipos más frecuentes eran SB0121 y SB0134, perfiles que se han detectado en todo el mundo (Stone *et al.*, 2012). Por tanto, nuestros resultados confirmarían que las cepas más prevalentes en las poblaciones animales son las que con mayor frecuencia se identifican también en el ser humano.

En tres de los ocho casos, los pacientes padecían cáncer de vejiga y recibieron instilaciones intravesicales de BCG para su tratamiento (Lamm, 1995); tras el cual, a uno de ellos se le diagnosticó una TB miliar, una complicación infrecuente pero descrita en la literatura (Colmenero *et al.*, 2012). El perfil de espoligotipo (67677377777600; SB0120) de los tres aislados se correspondió con el de una cepa de *M. bovis* BCG

(Goguet de la Salmonière *et al.*, 1997; Bauer *et al.*, 1999). A pesar de que se han descrito casos de TB humana por *M. bovis* con este espoligotipo (Kubica *et al.*, 2003; Lari *et al.*, 2006; Lari *et al.*, 2011; Malama *et al.*, 2014), lo más probable es que el origen de estos tres aislamientos esté en el tratamiento del carcinoma vesical.

En cuanto al resto de casos, había cuatro varones afectados y solo una mujer. Esta paciente (TBhEx128; SB0121), de nueve años de edad, era de origen marroquí y presentó una TB ganglionar cervical. Las adenopatías cervicales representan la forma más frecuente de presentación entre las TB extrapulmonares (LoBue *et al.*, 2003; Ayele *et al.*, 2004), y eran muy comunes en Europa hasta que se logró el control de la TB bovina en la cabaña ganadera y se generalizó la pasteurización de la leche. Actualmente es un proceso extremadamente raro en la población infantil autóctona, pero puede presentarse en inmigrantes originarios de países donde la TB bovina no está controlada y la ingestión de leche sin pasteurizar es habitual (Alfayate *et al.*, 2009). Por su parte, los hombres eran todos autóctonos, la localización anatómica de la TB fue pulmonar y sus edades fueron: 75 años (TBhEx031; SB0295), 76 años (TBhEx287; SB0121), 36 años (TBhEx399; SB0134) y 65 años (TBhEx432; SB0121). En la historia clínica de este último se mencionaba que el paciente se dedicaba a la ganadería, mientras que en la del hombre de 36 años se reflejaba que era trabajador de un matadero. En ambos casos, la TB podría estar asociada a una exposición ocupacional (Cousins y Dawson, 1999; Gibson *et al.*, 2004; Remacha *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2009). En los otros dos casos no se hacía ninguna referencia a la actividad profesional de los pacientes ni se destacaron otros antecedentes de interés, por lo que podría contemplarse cualquier posible vía de transmisión (O'Reilly y Daborn, 1995).

En conclusión, la existencia de algunos aislados clínicos de origen humano con el mismo espoligotipo que los aislados animales confirma que las personas que tienen

alguna relación profesional con animales infectados por *M. bovis* estarían especialmente expuestos al contagio de esta zoonosis.

16. Comparación de aislados humanos y animales de *Mycobacterium bovis* con idéntico espoligotipo

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue comparar los aislados de *M. bovis* procedentes de pacientes humanos con aislados de animales con idéntico espoligotipo para identificar el posible origen de la infección en estos pacientes y contribuir al conocimiento de la epidemiología de la TB humana causada por *M. bovis* en Extremadura. El análisis comparativo se llevó a cabo mediante la amplificación por PCR de 19 *loci* VNTR. El análisis con marcadores VNTR ha permitido detectar un elevado grado de diversidad genética en la población extremeña de *M. bovis*. Pese a ello, se encontró un aislado de origen humano con idéntico genotipo que el de tres aislados de origen animal. Sin embargo, no se ha podido demostrar que los casos humanos por *M. bovis* se deban a una transmisión reciente de los animales al hombre, por lo que probablemente sean consecuencia de la reactivación endógena de una infección adquirida en el pasado.

ABSTRACT

The aim of this study was to compare *M. bovis* isolates from human and animal origin which shared identical spoligotype to identify the possible source of infection in these patients and contribute to the knowledge of the epidemiology of human TB caused by *M. bovis* in Extremadura. This comparative analysis was performed by PCR amplification of 19 *loci* VNTR. VNTR analysis revealed a high degree of genetic diversity among Extremadura *M. bovis* population. It should be noted that one of the human isolates had an identical MLVA-18 profile as three isolates from animal origin. However, there was no evidence of recent animal-to-human transmission, so they were probably the result of endogenous reactivation of an infection acquired in the past.

INTRODUCCIÓN

Durante bastante tiempo el flujo de información entre las autoridades de Salud Pública y Sanidad Animal ha sido ineficiente debido a la ausencia de una estrategia común entre ambas. Afortunadamente, esta situación se está revirtiendo en los últimos años, toda vez que el control de las zoonosis resulta altamente beneficioso para el hombre y los animales. Las técnicas de caracterización molecular desarrolladas en las últimas décadas han permitido comparar aislados de origen humano y animal, y realizar estudios epidemiológicos en los que se ha podido demostrar la transmisión de la TB entre los animales y el hombre, y, en muchos casos, determinar el origen de la infección (Domínguez Rodríguez y Bezos Garrido, 2014). Sin embargo, son escasos los estudios de epidemiología molecular de la infección por *M. bovis* que integran en un mismo trabajo tanto a animales como a seres humanos (Romero *et al.*, 2006; Jenkins *et al.*, 2011; Malama *et al.*, 2014; Sanou *et al.*, 2014). El método de genotipado que habitualmente se ha utilizado para la caracterización molecular de *M. bovis* ha sido el espoligotipado, aunque la escasa discriminación que ofrece esta técnica en algunas situaciones hace que sea necesario complementarlo con otros métodos con mayor poder de discriminación como el MLVA (Pérez-Lago *et al.*, 2014b).

El objetivo de este estudio fue comparar los aislados de *M. bovis* procedentes de pacientes humanos con aislados de animales con idéntico espoligotipo para identificar el posible origen de la infección en estos pacientes y contribuir al conocimiento de la epidemiología de la TB humana causada por *M. bovis* en Extremadura. El análisis comparativo se ha llevado a cabo mediante la amplificación por PCR de 19 *loci* VNTR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados de *M. bovis*

El análisis se llevó a cabo en 141 aislados de *M. bovis* (incluidos tres aislados de *M. bovis* BCG) con los espoligotipos SB0120, SB0121, SB0134 y SB0295. Ocho aislados procedían de pacientes humanos (Apartado 15), 85 de ganado bovino (*Bos taurus*) y 48 de jabalíes (*Sus scrofa*). Los aislados de origen animal seleccionados para este análisis formaban parte de otra investigación (García-Jiménez, 2013). La selección de las 133 muestras de animales (29 con SB0120, 47 con SB0121, 29 con SB0134 y 28 con SB0295) se realizó entre los 915 aislados extremeños de *M. bovis* con esos espoligotipos (SB0120 [n = 79], SB0121 [n = 671], SB0134 [n = 68] y SB0295 [n = 97]) disponibles entre 2008 y 2012 en el Laboratorio de Micobacterias del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Extremadura. Siempre que fue posible se seleccionaron aislados procedentes de animales que vivían en fincas próximas al lugar de residencia de los pacientes humanos, y el resto de la muestra se completó seleccionando al azar aislados de animales de distintas localizaciones geográficas para que estuviera representada la población extremeña de *M. bovis* con cada uno de esos cuatro espoligotipos.

Genotipado de los aislados de *M. bovis* mediante el MLVA

El MLVA se llevó a cabo mediante la amplificación por PCR de 19 *loci* VNTR: 424, 577, 580, 802, 960, 1644, 1955, 2163a, 2163b, 2165, 2401, 2461, 2996, 3192, 3232, 3336, 3690, 4052 y 4156. Seis de estos marcadores (580, 2163a, 2163b, 2165, 2461 y 3232) han sido recomendados por la red de investigación internacional «VENoMYC» para el genotipado de *M. bovis* (Supply, 2006). El resto, salvo el *locus* 3336, forman parte del conjunto de 15 *loci* VNTR propuesto por Supply *et al.* (2006)

para estudios epidemiológicos con aislados de *M. tuberculosis*; que también ha sido probado para caracterizar aislados humanos de *M. bovis* (Lari *et al.*, 2011). Las PCR y el análisis de los productos amplificados se realizaron como se describe en el apartado 11. En la tabla 22 se muestran las secuencias de los pares de cebadores de los *loci* VNTR recomendados para la caracterización molecular de *M. bovis* y que no se utilizaron previamente en el genotipado de aislados clínicos de *M. tuberculosis* (Apartado 11).

«Mix de carrera»	Locus	Alias	Tamaño de repetición en pb	[MgCl ₂] (mM)	Pares de cebadores (5'a 3'), con el fluorocromo indicado entre paréntesis
Mix5	2163a	QUB 11a	69	2	CCCATCCCGCTTAGCACATTCGTA TTCAGGGGGGATCCGGGA (NED)
	2461	ETR-B	57	2	ATGGCCACCCGATACCGCTTCAGT (PET) CGACGGGCCATCTTGGATCAGCTAC
	3232	QUB-3232	56/57	2	TGCCGCCATGTTTCATCAGGATTAA GCAGACGTCGTGCTCATCGATACA (VIC)
	3336	QUB-3336	59	2	ATCCCCGCGGTACCCATC (FAM) TTCTACGACTTCGCAACCAAGTATC

Tabla 22: *Loci* VNTR recomendados para la caracterización molecular de *M. bovis* y que no se incluyen en el conjunto de 15 *loci* VNTR utilizado para el genotipado de aislados clínicos de *M. tuberculosis* (Apartado 11). El «Mix de carrera 5» indica los VNTR que se mezclaron para la misma electroforesis y el marcaje de cada uno de ellos. Los *loci* se identificaron con números que se corresponden con su posición (en kpb) en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv.

Análisis de los datos

La diversidad alélica (h) de cada uno de los *loci* VNTR, así como la tasa de agrupamiento y el poder de discriminación (HGDI) de las distintas combinaciones de *loci* se calcularon de igual forma que en el apartado 11. Para establecer la similitud genética entre las cepas se usó el *software* InfoQuest™ FP (Bio-Rad, EE. UU.), con el que se elaboró un dendrograma, utilizando el coeficiente categórico como medida de distancia genética y el UPGMA como algoritmo de agrupación.

RESULTADOS

Los problemas de amplificación observados en el *locus* 3336, que han sido descritos también por otros investigadores (Allix *et al.*, 2006; Supply *et al.*, 2006), hicieron que finalmente no se incluyera a este marcador en el análisis.

Con el conjunto de 18 *loci* VNTR se detectaron 84 genotipos distintos en los 141 aislados de *M. bovis* caracterizados (tabla 23). De estos, 22 fueron genotipos compartidos por dos o más aislados y 62 fueron genotipos únicos. El grupo de mayor tamaño estaba formado por 10 aislados, seguido de uno de nueve y otro de ocho; los tres grupos incluyeron tanto a animales domésticos como a salvajes, una situación que se repitió en nueve de los 22 grupos con genotipo compartido (fig. 25). De los ocho aislados humanos, uno (TBhEx432) presentó un genotipo idéntico al identificado en tres animales domésticos (TBbEx035, TBbEx036 y TBbEx039); este paciente era ganadero de profesión aunque no se ha podido establecer una relación directa entre él y estos animales. Los genotipos de los otros dos aislados humanos con SB0121 (TBhEx128 y TBhEx287) y del aislado con SB0295 (TBhEx031) mostraron una variación en un solo *locus* con respecto a tres genotipos identificados en jabalíes (M18Ex27, M18Ex24 y M18Ex59, respectivamente). La muestra TBhEx128 pertenecía a una niña de nueve años de origen marroquí, y no se encontró ninguna conexión entre esta y el jabalí; en los otros dos casos tampoco se ha podido establecer una relación entre las personas y los animales. Por su parte, el paciente con el espoligotipo SB0134 (TBhEx399) era trabajador de un matadero, aunque el perfil MLVA identificado en este enfermo presentaba tres o más *loci* de diferencia con respecto a los aislados animales de *M. bovis* con ese mismo espoligotipo incluidos en el análisis. Por último, los tres aislados humanos con espoligotipo SB0120 presentaron un perfil MLVA claramente distinto al de los aislados animales. Estos tres aislados mostraron en el *locus* 580 (MIRU4) una

variante alélica que carece de un fragmento de 53 pb en el extremo 3', algo que ya ha sido descrito en cepas de *M. bovis* BCG (Magdalena *et al.*, 1998; Lari *et al.*, 2006; Lari *et al.*, 2011). Hay que destacar que uno de estos aislados (TBhEx431) presentó una variación en dos *loci* con respecto a los otros dos aislados de *M. bovis* BCG.

La tabla 24 muestra la diversidad alélica en cada uno de los 18 *loci* VNTR amplificados. El *locus* en el que se observó mayor diversidad fue el 3232 ($h = 0.84$), mientras que el 802 y el 960 ($h = 0.01$) fueron los *loci* que menos variabilidad mostraron. Por su parte, en la tabla 25 se puede observar la tasa de agrupamiento y el HGDI acumulado en distintas combinaciones de *loci* VNTR formadas con la adición sucesiva de *loci* siguiendo un orden decreciente en función de la diversidad alélica observada en cada *locus*. Por otro lado, también se calcularon estos índices para el conjunto de 15 *loci* (MLVA15) propuesto por Supply *et al.* (2006) para la caracterización de *M. tuberculosis*, un conjunto de nueve *loci* (MLVA9) recomendado para el genotipado de *M. bovis* en España (Rodríguez-Campos *et al.*, 2013; Navarro *et al.*, 2014) y varias combinaciones de *loci* para identificar un subconjunto que proporcionase la misma discriminación que el conjunto completo de 18 *loci* utilizado en el presente trabajo (en la tabla 25 solo se muestra la combinación seleccionada). La discriminación obtenida con el conjunto de 18 *loci* VNTR (HGDI = 0.9833) se logró al combinar 12 *loci* (MLVA12): 3232, 2165, 1955, 2461, 2163b, 2163a, 2996, 577, 4052, 580, 1644 y 960. Este subconjunto no estaba formado por los 12 *loci* con mayor diversidad alélica, sino que se incluyeron algunos marcadores poco discriminatorios (1644 y 960) pero que mostraron una variación de un solo *locus* entre aislados estrechamente relacionados, es decir, que el *locus* en cuestión era el único de los 18 que permitía distinguir un aislado de otros con los que guardaba una estrecha relación genética (Allix *et al.*, 2006).

Espoligotipo	424	577	580	802	960	1644	1955	2163a	2163b	2165	2401	2461	2996	3192	3232	3690	4052	4156	Perfil MLVA	Nº de aislados	Hospedador (nº aislados)
SB0120 (n = 32)	0	5	4	2	2	3	1	11	2	5	4	5	5	3	6	5	5	1	M18Ex01	5	B
	0	5	4	2	2	3	1	11	2	4	4	3	5	3	6	5	5	1	M18Ex02	1	B
	0	5	4	2	2	3	1	11	2	5	4	3	5	3	6	5	5	1	M18Ex03	2	J
	0	5	4	2	2	3	1	11	2	5	4	3	5	3	5	5	5	1	M18Ex04	1	B
	0	5	4	1	2	3	1	11	2	4	4	5	5	3	6	5	5	1	M18Ex05	1	B
	0	5	4	2	2	3	1	7	2	5	4	3	5	3	7	5	5	1	M18Ex06	1	B
	0	3	4	2	2	3	1	11	4	4	4	4	5	3	6	5	5	1	M18Ex07	9	B (8) J (1)
	0	3	4	2	2	3	1	11	4	4	4	5	5	3	6	5	5	1	M18Ex08	1	B
	0	3	4	2	2	3	1	11	2	4	4	4	5	3	6	5	4	1	M18Ex09	1	J
	0	3	4	2	2	3	1	11	2	4	4	4	5	3	6	5	5	1	M18Ex10	1	J
	0	5	4	2	2	3	1	11	2	4	4	4	5	3	6	5	5	1	M18Ex11	1	J
	0	3	4	2	2	3	1	11	3	4	4	5	5	3	6	5	4	1	M18Ex12	3	B
	0	5	4	2	2	3	1	11	3	4	4	8	5	3	6	5	5	1	M18Ex13	1	B
	0	5	4	2	2	3	1	11	2	4	4	4	5	3	5	5	4	1	M18Ex14	1	J
	0	5	1s	2	2	3	1	11	3	5	2	5	5	3	5	5	5	0	M18Ex15	2	H
	0	6	2s	2	2	3	1	11	3	5	2	5	5	3	5	5	5	0	M18Ex16	1	H
SB0121 (n = 50)	2	5	4	2	2	3	3	11	2	6	4	2	8	3	8	5	5	1	M18Ex17	3	B (2) J (1)
	2	5	4	2	2	3	3	11	2	6	4	2	8	3	1	5	5	1	M18Ex18	1	B
	2	5	4	2	2	3	3	11	2	6	4	4	4	3	1	5	5	1	M18Ex19	1	B
	2	5	4	2	2	3	3	11	2	6	4	4	5	3	3	5	5	1	M18Ex20	2	B
	2	5	4	2	2	3	3	11	2	6	4	5	5	3	3	5	5	1	M18Ex21	1	B
	2	4	4	2	2	3	3	11	2	6	4	2	5	3	3	5	5	1	M18Ex22	1	B
	2	5	4	2	2	3	3	11	2	5	4	4	5	3	5	5	5	1	M18Ex23	4	B (3) H (1)
	2	5	4	2	2	3	3	11	2	5	4	4	5	3	2	5	5	1	M18Ex24	1	J
	2	5	4	2	2	3	3	11	2	5	4	4	5	3	7	5	5	1	M18Ex25	1	H
	2	5	4	2	2	3	1	11	2	5	4	4	5	3	8	5	5	1	M18Ex26	1	J
	2	5	4	2	2	3	3	11	2	5	4	4	5	3	8	5	5	1	M18Ex27	1	J
	2	5	4	2	2	3	3	10	2	5	4	4	5	3	8	5	5	1	M18Ex28	1	H
	2	5	4	2	2	3	2	11	2	5	4	4	5	3	5	5	5	1	M18Ex29	1	J
	2	5	4	2	2	3	2	11	2	5	4	4	5	3	4	5	5	1	M18Ex30	1	J
	2	5	4	2	2	3	3	11	2	5	4	3	5	3	4	5	5	1	M18Ex31	2	B
	2	5	5	2	2	3	2	11	2	5	4	4	5	3	8	5	5	1	M18Ex32	4	B (2) J (2)
	2	5	5	2	2	3	2	11	2	5	4	4	5	3	3	5	5	1	M18Ex33	1	B
	2	5	5	2	2	3	2	11	2	5	4	4	5	3	0	5	5	1	M18Ex34	1	J
	2	5	4	2	2	3	3	11	2	4	4	4	6	3	3	5	5	1	M18Ex35	1	B
	2	5	4	2	2	3	3	11	2	5	4	4	3	3	3	5	5	1	M18Ex36	1	B
	2	5	4	2	2	3	3	5	2	6	4	4	6	3	2	5	4	1	M18Ex37	1	B
	2	5	4	2	2	3	3	13	2	6	4	4	6	3	2	5	4	1	M18Ex38	1	J
	2	5	4	2	2	3	3	13	2	6	4	4	6	3	4	5	4	1	M18Ex39	1	J
	2	5	4	2	2	3	3	5	2	6	4	4	6	3	3	5	4	1	M18Ex40	1	J
	2	5	4	2	2	3	3	13	2	6	4	4	5	3	7	5	4	1	M18Ex41	1	J
	2	3	4	2	2	3	3	11	2	6	4	5	5	3	2	4	5	1	M18Ex42	1	B

Tabla 23: Perfiles MLVA encontrados en los aislados de *M. bovis* dentro de cada grupo con idéntico espoligotipo.

Continúa en la siguiente página

Espilogotipo	424	577	580	802	960	1644	1955	2163a	2163b	2165	2401	2461	2996	3192	3232	3690	4052	4156	Perfil MLVA	Nº de aislados	Hospedador (nº aislados)
SB0121 (n = 50)	2	3	4	2	2	3	3	11	1	6	4	5	5	3	2	4	5	1	M18Ex43	1	B
	2	5	4	2	2	3	3	11	2	6	4	4	5	3	2	4	5	1	M18Ex44	1	B
	2	5	4	2	2	3	3	11	3	6	4	3	4	3	1	5	4	1	M18Ex45	1	B
	2	3	5	2	2	3	3	11	2	5	4	3	5	3	3	5	5	1	M18Ex46	1	B
	2	3	5	2	2	3	3	11	2	5	4	3	5	3	1	5	5	1	M18Ex47	1	J
	2	3	4	2	2	3	3	11	2	5	4	3	5	3	1	5	4	1	M18Ex48	1	J
	2	3	4	2	2	3	3	11	2	6	4	3	5	3	2	5	4	1	M18Ex49	1	J
	2	3	4	2	2	3	3	11	2	6	4	3	5	3	7	5	4	1	M18Ex50	1	J
	2	3	4	2	2	3	2	10	2	6	4	4	2	3	3	5	5	1	M18Ex51	1	B
	2	3	4	2	2	3	2	11	1	6	4	4	2	3	3	5	2	1	M18Ex52	1	B
	2	3	4	2	2	3	2	11	2	5	4	4	5	3	2	5	4	1	M18Ex53	1	B
	2	3	4	2	2	3	2	11	2	6	4	4	2	3	2	5	4	1	M18Ex54	1	J
	2	3	3	2	2	3	2	11	2	6	4	4	5	3	5	5	5	1	M18Ex55	1	B
2	3	4	2	2	3	2	11	2	6	3	5	5	2	3	5	5	1	M18Ex56	1	B	
SB0295 (n = 29)	2	5	4	2	2	3	3	11	2	6	4	4	5	3	7	5	5	1	M18Ex57	8	B (5) J (3)
	2	5	4	2	2	2	3	11	2	6	4	4	5	3	7	5	5	1	M18Ex58	1	B
	2	5	4	2	2	3	3	11	2	6	4	4	5	3	11	5	5	1	M18Ex59	2	J
	2	5	4	2	2	3	3	11	2	6	4	4	5	3	9	5	5	1	M18Ex60	1	H
	2	5	4	2	2	3	3	12	2	6	4	4	5	3	7	5	5	1	M18Ex61	4	B (1) J (3)
	2	5	4	2	2	3	3	9	2	6	4	4	5	3	7	5	5	1	M18Ex62	1	B
	2	5	4	2	2	3	3	11	2	4	4	4	5	3	7	5	5	1	M18Ex63	1	B
	2	5	4	2	1	3	3	11	2	6	4	4	5	3	7	5	5	1	M18Ex64	1	B
	2	1	4	2	2	3	5	11	1	6	4	4	5	3	7	5	5	1	M18Ex65	1	B
	2	1	4	2	2	3	3	11	1	6	4	4	5	3	7	5	5	1	M18Ex66	1	B
	2	5	4	2	2	3	3	9	2	5	4	4	5	3	8	5	4	1	M18Ex67	1	B
	2	5	4	2	2	3	3	11	2	5	4	4	5	3	8	5	4	1	M18Ex68	5	B (4) J (1)
	2	5	4	2	2	3	4	10	2	6	4	3	5	3	7	5	7	1	M18Ex69	2	B
SB0134 (n = 30)	0	5	4	2	2	3	1	11	4	5	4	4	5	4	6	5	5	1	M18Ex70	2	B (1) J (1)
	2	5	4	2	2	2	2	10	4	3	4	5	4	3	5	5	5	1	M18Ex71	2	J
	2	5	4	2	2	2	2	10	4	3	4	5	4	3	6	5	5	1	M18Ex72	1	J
	2	5	4	2	2	3	2	10	4	3	4	5	4	3	6	5	5	1	M18Ex73	2	B (1) J (1)
	2	5	4	2	2	3	2	10	4	3	4	5	4	3	5	5	5	1	M18Ex74	10	B (1) J (9)
	2	5	4	2	2	3	2	10	2	3	4	5	4	3	5	5	5	1	M18Ex75	1	B
	2	5	4	2	2	3	2	10	3	3	4	5	4	3	5	5	5	1	M18Ex76	2	B
	2	5	5	2	2	3	2	10	4	3	4	5	4	3	5	5	5	1	M18Ex77	1	B
	2	5	4	2	2	3	2	9	4	3	4	6	4	3	5	5	5	1	M18Ex78	2	B
	2	5	4	2	2	3	2	10	5	3	4	4	4	3	5	5	4	1	M18Ex79	1	H
	2	5	4	2	2	2	2	10	3	3	4	5	4	2	2	5	5	1	M18Ex80	2	B
	2	6	4	2	2	3	3	10	3	6	4	2	5	4	5	6	5	1	M18Ex81	1	B
	2	6	4	2	2	3	3	9	3	6	4	2	5	4	5	6	5	1	M18Ex82	1	B
	2	5	4	2	2	3	3	10	4	6	4	2	5	3	6	6	3	1	M18Ex83	1	B
	2	5	4	2	2	3	3	10	4	6	4	2	5	3	5	6	5	1	M18Ex84	1	B

Tabla 23: Perfiles MLVA encontrados en los aislados de *M. bovis* dentro de cada grupo con idéntico espilogotipo (continuación). 0: Corresponde a alelos desprovistos de cualquier unidad de repetición. s: alelo con tamaño intermedio. Abreviaturas: B (ganado bovino), H (humano) y J (jabalí).

<i>Locus</i>	Nº de aislados con cada alelo ^a															Diversidad alélica	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	1s		2s
424	34		107														0.37
577		2		28	1	107	3										0.39
580				1	128	9									2	1	0.17
802		1	140														0.01
960		1	140														0.01
1644			6	135													0.08
1955		35	38	65	2	1											0.66
2163a						2		1		5	29	97	4	3			0.48
2163b		4	90	14	32	1											0.53
2165				24	22	44	51										0.72
2401			3	1	137												0.05
2461			9	15	76	38	2		1								0.62
2996			3	1	26	102	5		4								0.44
3192			3	134	4												0.10
3232	1	5	11	12	4	33	32	24	16	1		2					0.84
3690					3	134	4										0.10
4052			1	1	23	114		2									0.32
4156	3	138															0.04

Tabla 24: Determinación de la diversidad alélica de cada *locus* VNTR amplificado en los 141 aislados de *M. bovis*.

^a Cada alelo se corresponde con el tamaño del fragmento producido por la amplificación de todo el *locus*; como el tamaño de la unidad de repetición es conocido, se considera que el tamaño del amplicón representa el número de repeticiones en cada *locus*. 0: Corresponde a alelos desprovistos de cualquier unidad de repetición. s: alelo con tamaño intermedio.

Combinación de <i>loci</i>	<i>Locus</i> VNTR (<i>h</i>)	Nº de genotipos diferentes	Nº de aislados con genotipo único	Nº de genotipos compartidos	Nº de aislados agrupados	Tasa de agrupamiento %	HGDI acumulado
1	3232 (0.84)						
2	2165 (0.72)	26	7	19	134	95.03 %	0.9213
3	1955 (0.66)	39	18	21	123	87.23 %	0.9369
4	2461 (0.62)	56	32	24	109	77.30 %	0.9585
5	2163b (0.53)	65	41	24	100	70.92 %	0.9681
6	2163a (0.48)	74	51	23	90	63.82 %	0.9770
7	2996 (0.44)	74	51	23	90	63.82 %	0.9770
8	577 (0.39)	76	53	23	88	62.41 %	0.9774
9	424 (0.37)	76	53	23	88	62.41 %	0.9774
10	4052 (0.32)	77	58	21	83	58.86 %	0.9781
11	580 (0.17)	80	59	21	82	58.15 %	0.9793
12	3192 (0.10)	80	59	21	82	58.15 %	0.9793
13	3690 (0.10)	80	59	21	82	58.15 %	0.9793
14	1644 (0.08)	83	61	22	80	56.73 %	0.9825
15	2401 (0.05)	83	61	22	80	56.73 %	0.9825
16	4156 (0.04)	83	61	22	80	56.73 %	0.9825
17	802 (0.01)	83	61	22	80	56.73 %	0.9825
18	960 (0.01)	84	62	22	79	56.02 %	0.9833
MLVA15 ^a		54	33	21	108	76.59 %	0.9548
MLVA9 ^b		76	52	24	89	63.12 %	0.9786
MLVA12 ^c		84	62	22	79	56.02 %	0.9833

Tabla 25: Tasa de agrupamiento y HGDI calculados con la adición sucesiva de los *loci* VNTR analizados, así como con distintas combinaciones de estos. ^a Conjunto propuesto por Supply *et al.* (2006). ^b 580, 2163a, 2163b, 2165, 2461, 2996, 3192, 3232 y 4052. ^c 3232, 2165, 1955, 2461, 2163b, 2163a, 2996, 577, 4052, 580, 1644 y 960.

UFOMA- Categorical (1)

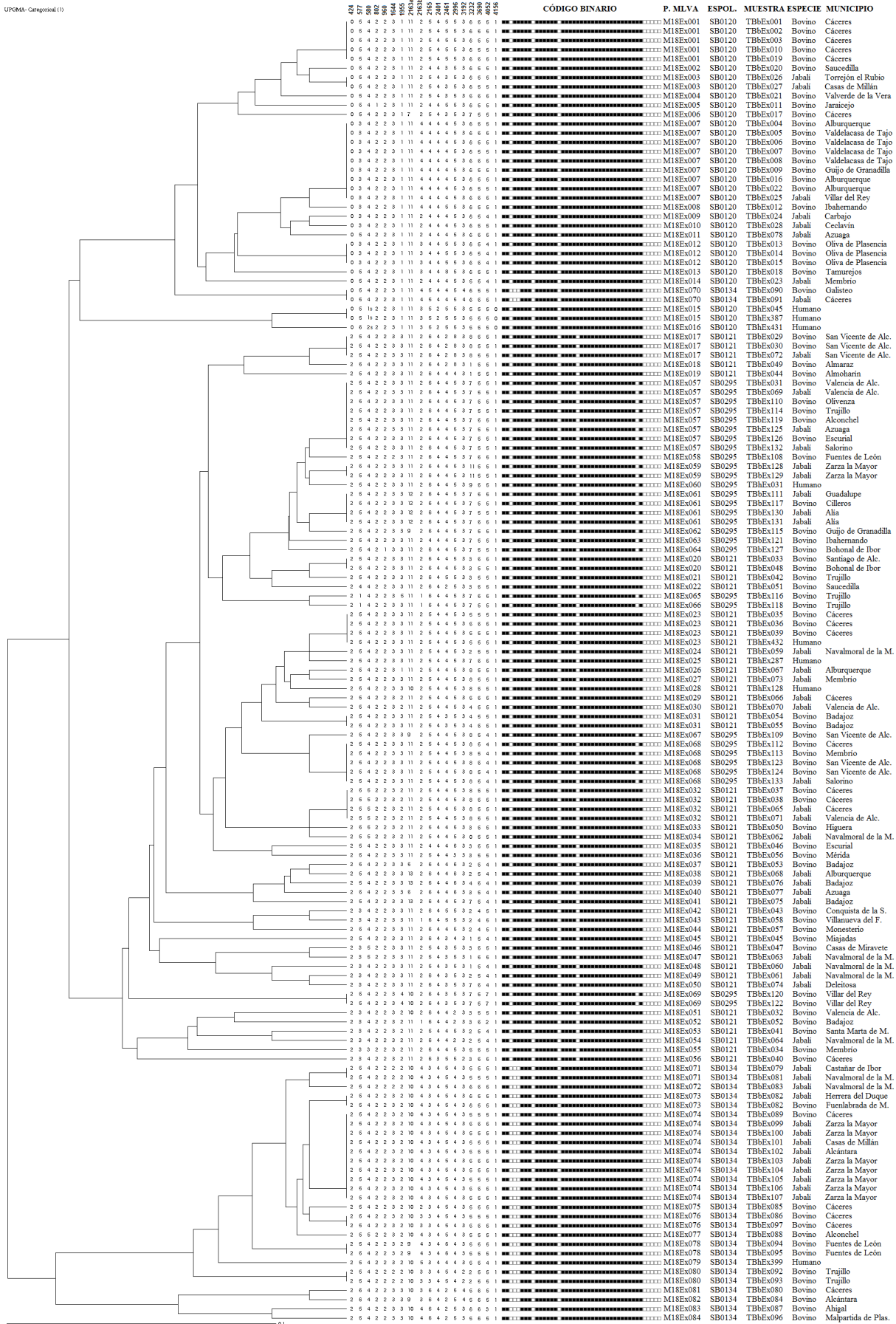


Figura 25: Dendrograma elaborado con los genotipos identificados en los 141 aislados de *M. bovis*.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se ha realizado un análisis comparativo de aislados humanos y animales de *M. bovis* con idéntico espoligotipo para identificar el posible origen de las infecciones humanas por este agente patógeno en Extremadura. La utilización de un conjunto de 18 *loci* VNTR para la caracterización molecular de aislados de *M. bovis* con los espoligotipos SB0120, SB0121, SB0134 y SB0295 reveló un alto grado de diversidad genética en la población extremeña de *M. bovis*. Aun así, en un hombre se identificó un genotipo idéntico al encontrado en tres animales domésticos. A este ganadero de 65 años de edad, se le diagnosticó una TB pulmonar y en su explotación se detectaron animales reaccionantes positivos en los saneamientos ganaderos, por tanto, se podría contemplar la posibilidad de una transmisión entre especies. Sin embargo, no se pudo establecer una relación directa entre este paciente y el grupo de animales en el que se identificó la misma cepa, por lo que difícilmente se puede determinar si la enfermedad fue consecuencia de un evento de transmisión reciente o, teniendo en cuenta su edad, si se debía a la reactivación endógena de una infección que pudo ocurrir incluso antes de la implantación de los tratamientos térmicos de la leche y de las campañas oficiales de saneamiento ganadero. Asimismo, se pudo establecer un probable riesgo de exposición a *M. bovis* en el paciente con el espoligotipo SB0134, ya que en su historia clínica se mencionaba que era trabajador de un matadero; no obstante, el perfil MLVA identificado en este paciente presentaba tres o más *loci* de diferencia con respecto a los aislados animales de *M. bovis* con ese mismo espoligotipo. A pesar de que la fecha del aislamiento fue diciembre de 2009 y en el análisis se incluyen aislados animales desde el año 2008, es posible que esta persona se infectase unos años antes; el retraso entre la exposición y la posterior reactivación puede ser la causa de que la cepa identificada en este enfermo no se haya detectado en los

animales, debido a los posibles cambios en la circulación de cepas de *M. bovis* en la población bovina (Pérez-Lago *et al.*, 2014b). No obstante, este paciente presentaba otros factores de riesgo asociados con la TB, como haber estado en un centro penitenciario o el CDVP, por tanto, aunque la hipótesis de la exposición ocupacional parece la más probable, tampoco se puede descartar una transmisión de *M. bovis* de persona a persona (Evans *et al.*, 2007) con una cepa que podría no estar presente en la fauna extremeña; especialmente teniendo en cuenta que el espoligotipo SB0134 fue uno de los más prevalentes en un estudio sobre TB humana por *M. bovis* y *M. caprae* realizado en España (Rodríguez *et al.*, 2009). Por su parte, los genotipos de los otros tres aislados humanos de *M. bovis* mostraron una variación en un solo *locus* con respecto a tres cepas aisladas en jabalíes. Hay autores que sugieren que en entornos de alta diversidad puede ser necesaria una interpretación menos estricta de los resultados del genotipado para poder identificar las posibles fuentes de infección (Rodríguez-Campos *et al.*, 2011). Aun coincidiendo en parte con estos autores, consideramos que en los casos de TB humana por *M. bovis* de nuestro estudio no deberíamos aplicar este planteamiento, ya que, por ejemplo, la falta de conexiones entre la niña de origen marroquí y el jabalí en el que se identificó un genotipo similar hace que resulte poco probable que esta paciente se contagiase en nuestro país. A su vez, el hecho de que la niña presentase una adeonopatía cervical daría mayor fuerza a la posibilidad de que la infección tuviera lugar en Marruecos, donde la TB bovina no está controlada y la ingestión de leche sin pasteurizar es habitual, y no en España (Hervás Castillo *et al.*, 2007; Alfayate *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2009). Aunque también existe una proximidad genética entre los genotipos identificados en otros dos pacientes (TBhEx031 y TBhEx297) y dos cepas aisladas en animales, la avanzada edad de estos enfermos (75 y 76 años, respectivamente) y su estado de inmunodepresión, señalarían a la reactivación endógena

de una infección adquirida en el pasado como la causa más probable de la enfermedad en ambos casos. Por último, resultó interesante encontrar que uno (TBhEx431) de los tres aislados de *M. bovis* BCG presentó una variación en dos *loci* con respecto a los otros dos aislados, lo que indica que en este paciente se produjo una microevolución, que pudo ser la causa de la TB miliar diagnosticada en este enfermo tras recibir instilaciones de BCG para el tratamiento del cáncer de vejiga.

Por otro lado, también ha quedado probado que el ganado doméstico y la fauna salvaje pueden compartir cepas de *M. bovis*. En general, se ha observado que los animales de la misma explotación presentan genotipos idénticos. Asimismo se han evidenciado coincidencias genotípicas entre aislados de bovinos y jabalíes que viven en fincas del mismo término municipal, si bien, no todos los animales con idéntico espoligotipo que habitan en fincas del mismo término presentaron el mismo genotipo (fig. 25). De igual modo se ha comprobado que los animales de una finca pueden presentar perfiles MLVA con diferencias en algún *locus* VNTR, como en el caso de los bovinos de las muestras TBbEx085 (M18Ex75) y TBbEx086 (M18Ex76), lo que indica que en la infección por *M. bovis* también es frecuente detectar variantes clonales (Rodríguez-Campos *et al.*, 2013). Algo más común ha sido encontrar animales que se cazaron en la misma montería (se entiende que han compartido hábitat) con genotipos diferentes, en algunos casos con hasta cuatro *loci* VNTR de diferencia en el perfil MLVA, como por ejemplo entre el jabalí TBbEx059 (M18Ex24) y los jabalíes TBbEx060 (M18Ex48) y TBbEx061 (M18Ex49). Otros casos similares son los de las muestras TBbEx075 (M18Ex41) y TBbEx076 (M18Ex39) por un lado, y TBbEx070 (M18Ex30) y TBbEx071 (M18Ex32) por otro, que pertenecen a jabalíes abatidos en la misma cacería pero en los que se identificaron perfiles con diferencias en dos *loci*. Sin embargo, TBbEx071 presentó un genotipo idéntico (SB0121/M18Ex32) al de otro jabalí

y dos bovinos, aun habiendo sido cazado en una finca de un término municipal distinto al de las fincas de los otros tres animales; si bien, todos tienen en común su proximidad a la Sierra de San Pedro. Una situación parecida se observó en el grupo formado por cinco animales (cuatro bovinos y un jabalí) con el genotipo SB0295/M18Ex68, ya que, salvo dos bovinos de la misma explotación, el resto habitaban en fincas de diferentes municipios próximos a la Sierra de San Pedro, lo que indica que el jabalí podría actuar como elemento dispersor de cepas, o variantes clonales, dentro de esta área (Parra *et al.*, 2005; Hermoso de Mendoza *et al.*, 2006). Curiosamente, el suido (TBbEx133) con el perfil M18Ex68 fue abatido en la misma acción cinegética que otro jabalí (TBbEx132) que presentó un genotipo diferente (SB0295/M18Ex57), el cual también se identificó en otros animales, tanto domésticos como salvajes, que vivían en distintas fincas repartidas por toda la geografía extremeña. Estas observaciones sugieren que el contagio entre el ganado bovino y los artiodáctilos salvajes parece frecuente en Extremadura (Hermoso de Mendoza *et al.*, 2006).

El MLVA podría ser un método apropiado para la caracterización molecular de *M. bovis*, sin embargo, aún no existe un conjunto normalizado de *loci* VNTR que asegure una buena discriminación en cualquier parte del mundo. Hasta ahora solo se han encontrado diferentes combinaciones de *loci* VNTR validadas únicamente en determinados países (Boniotti *et al.*, 2009; Duarte *et al.*, 2010; McLernon *et al.*, 2010) y, según Boniotti *et al.* (2009), probablemente las poblaciones de *M. bovis* en los distintos países son demasiado diversas como para lograr un consenso sobre un conjunto de marcadores útiles en cualquier situación. Aun así, sigue siendo necesario evaluar la capacidad discriminativa de varios *loci* de forma individual y en combinación con otros antes de proponer su uso generalizado (Romero *et al.*, 2006), por lo que cualquier trabajo que intente aportar algo de información a este respecto debería

ser bien recibido. En nuestro estudio, el análisis con un conjunto de 18 *loci* VNTR mostró una alta heterogeneidad clonal, especialmente en el grupo de aislados con el espoligotipo SB0121, el más prevalente en la península ibérica (Duarte *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2010), coincidiendo con otros trabajos tanto de España (Rodríguez-Campos *et al.*, 2013) como de Portugal (Duarte *et al.*, 2010; Cunha *et al.*, 2012). El poder discriminatorio observado en el presente trabajo puede considerarse alto (HGDI = 0.9833) teniendo en cuenta que en la muestra solo se incluyeron aislados de cuatro espoligotipos. Sin embargo, encontramos una combinación de 12 *loci* (3232, 2165, 1955, 2461, 2163b, 2163a, 2996, 577, 4052, 580, 1644 y 960) que proporcionó la misma discriminación que el conjunto de 18 VNTR. En este subconjunto se incluyen ocho de los nueve *loci* que se han probado con éxito en investigaciones llevadas a cabo en nuestro país (Rodríguez-Campos *et al.*, 2013; Navarro *et al.*, 2014); el único *locus* que no se eligió fue el 3192, debido a que no aportó ningún perfil extra a una combinación de 10 marcadores con una diversidad alélica superior a la ofrecida por ese *locus*. Por su parte, sí se incluyó al *locus* 1955, que fue el tercero con mayor diversidad alélica en nuestro estudio y que hasta el momento no había sido recomendado. También se eligieron dos *loci* (1644 y 960) que, a pesar de presentar una baja diversidad alélica, fueron capaces de diferenciar aislados estrechamente relacionados. No obstante, es posible que nuestra muestra sea pequeña y poco representativa, por lo que estas observaciones deberían ser confirmadas con estudios que analicen un mayor número de aislados de *M. bovis*.

En conclusión, la integración de los esfuerzos de médicos y veterinarios para llevar a cabo un estudio de epidemiología molecular común en Extremadura ha permitido mejorar nuestro conocimiento sobre la TB humana causada por *M. bovis* en esta región. En nuestra investigación, en la que se ha utilizado un método de genotipado

altamente discriminatorio como el MLVA, se ha demostrado que en la actualidad sigue existiendo un fuerte vínculo entre las enfermedades animales y las humanas; por ello, creemos que es necesario darle continuidad a este estudio y seguir trabajando en línea con el concepto de «un mundo, una salud».

Conclusiones

1. El uso combinado del espoligotipado y el MLVA con 15 *loci* VNTR ha permitido demostrar la existencia de una elevada diversidad genética entre las cepas de *M. tuberculosis* que causan la TB humana en Extremadura, con un claro predominio de las familias que se corresponden con el linaje Euro-americano.
2. Una parte importante de los casos nuevos de TB podría ser atribuida a la transmisión reciente, por lo que es necesario intensificar las medidas de búsqueda activa de casos entre los contactos de pacientes con TB, especialmente en autóctonos de menos de 30 años, grupo poblacional que parece contribuir activamente a la transmisión de la enfermedad.
3. A pesar de la importante proporción de casos agrupados, la reactivación endógena de la infección latente parece la principal causa de la enfermedad en la población extremeña. Dado que dicha reactivación puede ocurrir hasta pasados ocho años desde el contagio, los programas de lucha y control de la TB deberían centrar sus esfuerzos a medio y largo plazo en la aplicación de medidas para prevenir que la enfermedad se desarrolle.
4. La influencia de la inmigración en la epidemiología de la TB en Extremadura es escasa. Por tanto, este trabajo confirma que en nuestra región, por el momento, no es necesario adoptar medidas específicas para controlar la enfermedad en la población inmigrante.

5. El análisis molecular de los aislados clínicos, mediante técnicas de genotipado como el MLVA, permitiría detectar a tiempo posibles casos con cultivos falsos positivos por contaminación cruzada en el laboratorio, por lo que debería implantarse el uso sistemático de estas técnicas en los hospitales.
6. La complejidad clonal en la infección por *M. tuberculosis* también puede ser identificada en entornos de baja incidencia de la enfermedad como Extremadura. Aun así, las infecciones mixtas, los casos de TB recurrente por reinfección exógena y de heterorresistencia son poco comunes en esta región.
7. La TB humana causada por *M. bovis* es un proceso poco frecuente en Extremadura.
8. Los datos epidemiológicos disponibles no han permitido demostrar que los casos de TB humana por *M. bovis* sean consecuencia de una transmisión reciente, sino que probablemente se deban a la reactivación endógena de una infección adquirida en el pasado.

Resumen

Se ha realizado un estudio epidemiológico retrospectivo de base poblacional en el que se incluyeron todos los aislados clínicos del MTBC reunidos entre enero de 1998 y mayo de 2012 en el Laboratorio de Microbiología del Complejo Hospitalario de Cáceres. En nuestro trabajo, hemos utilizado el espoligotipado para determinar el genotipo de aislados clínicos con el objetivo de definir la estructura genética de la población de cepas de *M. tuberculosis* aisladas en Extremadura. Los resultados obtenidos mediante el espoligotipado muestran una elevada diversidad genética entre las cepas de *M. tuberculosis* que causan la TB humana en Extremadura, con un claro predominio de las familias que se corresponden con el linaje Euro-americano. También hemos utilizado el MLVA para determinar el genotipo de esta colección de aislados de *M. tuberculosis* que previamente había sido caracterizada mediante el espoligotipado. El objetivo fue obtener más conocimientos acerca de la aplicabilidad de estrategias de genotipado con marcadores VNTR en un entorno de baja incidencia de TB como es Extremadura. Se propone el uso del MLVA con un conjunto reducido de 12 *loci* VNTR como técnica de primera línea para el genotipado de aislados clínicos de *M. tuberculosis* en Extremadura. Los resultados del espoligotipado y el MLVA obtenidos en análisis previos se analizaron de forma conjunta con el objetivo de evaluar la utilidad de combinar ambos métodos para el estudio de la diversidad genética de *M. tuberculosis* en Extremadura, así como para dilucidar ciertos aspectos evolutivos. El estudio combinado de los resultados mostró que la complejidad existente entre la población de cepas de *M. tuberculosis* en Extremadura fue mayor de la observada con cada método por separado.

Nuestros resultados demuestran que el uso combinado del espoligotipado y el MLVA es una estrategia de genotipado adecuada para el estudio de la diversidad genética de *M. tuberculosis* en Extremadura, pudiendo contribuir también al esclarecimiento de determinadas relaciones evolutivas.

En otra parte del estudio se pretendió describir los factores asociados con la agrupación de casos de TB y determinar la influencia de la transmisión reciente en la distribución de la enfermedad en la población extremeña. Los datos sociodemográficos, clínicos y epidemiológicos de los pacientes se obtuvieron a partir de la historia clínica. Los resultados de este trabajo ponen de manifiesto que una parte importante, aproximadamente el 45 %, de los casos de TB en Extremadura podría ser atribuida a la transmisión reciente; esto implica la necesidad de intensificar las medidas de búsqueda activa de casos entre los contactos de pacientes con TB. Nuestros resultados también demuestran que la complejidad clonal en la infección por *M. tuberculosis* puede ser identificada en entornos de baja incidencia de la enfermedad. Aun así, las infecciones mixtas, los casos de TB recurrente por reinfección exógena y de heterorresistencia son poco comunes en Extremadura.

En esta investigación llevada a cabo en Extremadura se han identificado ocho aislados de *M. bovis*, incluidos tres *M. bovis* BCG. Los perfiles de espoligotipo observados en esas muestras fueron: SB0120, SB0121, SB0134 y SB0295. Estos perfiles coinciden con los de cepas aisladas tanto en animales domésticos como en animales salvajes que habitan en fincas de Extremadura. Asimismo se compararon los aislados de *M. bovis* procedentes de pacientes humanos con aislados de animales con idéntico espoligotipo para identificar el posible origen de la infección en estos pacientes y contribuir al conocimiento de la epidemiología de la TB humana causada por *M. bovis* en Extremadura. El análisis con marcadores VNTR ha permitido detectar un elevado

grado de diversidad genética en la población extremeña de *M. bovis*. Pese a ello, se encontró un aislado de origen humano con idéntico genotipo que el de tres aislados de origen animal. Sin embargo, no se ha podido demostrar que los casos humanos por *M. bovis* se deban a una transmisión reciente de los animales al hombre, por lo que probablemente sean consecuencia de la reactivación endógena de una infección adquirida en el pasado.

Lista de abreviaturas

- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ARN: ácido ribonucleico
- BCG: bacilo de Calmette-Guérin
- C: Citosina
- CDVP: consumo de drogas por vía parenteral
- CRISPR: repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)
- dNTP: desoxi-nucleótidos trifosfatos
- DR: repetición directa (*direct repeat*)
- DVR: repetición directa variable (*direct variant repeat*)
- ECDC: Centro Europeo para la Prevención y Control de las Enfermedades (*European Centre for Disease Prevention and Control*)
- EE. UU.: Estados Unidos
- EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica
- ETR: repeticiones en tándem exactas (*exact tandem repeat*)
- G: Guanina
- HGDI: índice de discriminación de Hunter-Gaston (*Hunter-Gaston discriminatory index*)
- IC: Intervalo de confianza
- IR: repeticiones intercaladas (*interspersed repeats*)
- IS: secuencia de inserción (*insertion sequence*)
- kb: kilobase
- kpb: kilo par de bases
- LSP: polimorfismo de gran secuencia (*large-sequence polymorphism*)
- MAC: complejo *Mycobacterium avium* (*Mycobacterium avium complex*)
- Mb: Megabase
- MIRU: unidades de repetición intercaladas en el genoma de las micobacterias (*mycobacterial interspersed repetitive units*)
- MLVA: análisis del número variable de repeticiones en tándem de múltiples *loci* (*Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis*)
- MOTT: micobacterias distintas del bacilo tuberculoso (*mycobacteria other than tubercle bacilli*)

- MPTR: repetición en tándem con polimorfismos mayoritarios (*major polymorphic tandem repeat*)
- MST: árbol de mínima expansión (*minimal spanning tree*)
- MTBC: complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis complex*)
- NTM: micobacterias no tuberculosas (*nontuberculous mycobacteria*)
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- OR: *odds ratio*
- pb: pares de bases
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)
- PGRS: secuencias repetitivas polimórficas ricas en G+C (*polymorphic GC-rich repetitive sequences*)
- PPD: derivado proteico purificado (*purified protein derivative*)
- RD: región de diferencia (*region of difference*)
- RFLP: polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (*restriction fragment length polymorphism*)
- RTI: índice de transmisión reciente (*recent transmission index*)
- SB: *spoligotype bovis*
- SIT: *spoligotype international type*
- SNP: polimorfismos de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphisms*)
- TB: tuberculosis
- TB-MR: tuberculosis multirresistente
- TR: repetición en tándem (*tandem repeat*)
- UE/AEE: Unión Europea / Área Económica Europea
- UE: Unión Europea
- VIH: virus de la inmunodeficiencia humana
- VNTR: número variable de repeticiones en tándem (*variable number of tandem repeats*)

Lista de figuras

Figura 1: Pioneros en el estudio de la tuberculosis	20
Figura 2: Estimación de las tasas de incidencia de la TB, 2012.....	24
Figura 3: Representación esquemática de la envoltura celular de <i>M. tuberculosis</i>	40
Figura 4: Esquema de la posible filogenia del MTBC.	48
Figura 5: <i>Filogeografía</i> global de los siete principales linajes del MTBC adaptados a los seres humanos	52
Figura 6: Composición celular del granuloma tuberculoso.....	57
Figura 7: Progresión del granuloma de la TB humana.....	58
Figura 8: Mecanismo y consecuencias de la formación de granulomas en la fase inicial de la infección.....	60
Figura 9: Evolución del foco infeccioso hasta la necrosis del tejido y la calcificación de la lesión.....	62
Figura 10: Modelo evolutivo de la infección tuberculosa	71
Figura 11: Representación gráfica del método RFLP-IS6110 utilizado para la caracterización genotípica de dos cepas (1 y 2) de <i>M. tuberculosis</i>	85
Figura 12: Representación gráfica que ilustra el fundamento para la determinación del genotipo del MTBC mediante el espoligotipado	94
Figura 13: Esquema que ilustra el principio sobre el que se apoya el MLVA	95
Figura 14: Imagen de un gel de agarosa utilizado para la caracterización, mediante PFGE, de cepas verotoxigénicas de <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	103
Figura 15: Ilustración de las posibles causas de infecciones mixtas	118
Figura 16: Distribución de los aislados clínicos del estudio por año de aislamiento... ..	136
Figura 17: MST que muestra las relaciones filogenéticas entre los espoligotipos de <i>M. tuberculosis</i> identificados en Extremadura	140
Figura 18: Dendrograma (simplificado) elaborado a partir de los espoligotipos encontrados en los 436 aislados de <i>M. tuberculosis</i> de Extremadura.	141
Figura 19: MST elaborado a partir de los datos del MLVA que muestra la relación genética entre las cepas de <i>M. tuberculosis</i>	164
Figura 20: Dendrograma (simplificado) elaborado con los perfiles MLVA encontrados en los 403 aislados de <i>M. tuberculosis</i>	165
Figura 21: MST elaborados a partir de los aislados con los tres espoligotipos más prevalentes en Extremadura.	180
Figura 22: MST, compuesto con los resultados obtenidos en el MLVA y el espoligotipado, que ilustra la relación evolutiva entre los 403 aislados de <i>M. tuberculosis</i>	181
Figura 23: Distribución de casos de pacientes extranjeros por país de origen.....	196
Figura 24: Detección de un caso (TBhEx053) de infección mixta mediante el análisis de los 15 <i>loci</i> VNTR.....	216
Figura 25: Dendrograma elaborado con los genotipos identificados en los 141 aislados de <i>M. bovis</i>	236

Lista de tablas

Tabla 1: Presentación clínica de la tuberculosis pulmonar.....	74
Tabla 2: Signos y síntomas de la tuberculosis extrapulmonar	75
Tabla 3: Idoneidad de los marcadores genéticos o técnica de caracterización molecular en sus diferentes aplicaciones.....	82
Tabla 4: Principales <i>loci</i> VNTR utilizados en los estudios de caracterización genotípica de los aislados del MTBC mediante el MLVA.....	101
Tabla 5: Espoligotipos encontrados en los 436 aislados de <i>M. tuberculosis</i> analizados.	140
Tabla 6: Familias de <i>M. tuberculosis</i> en la población de cepas extremeñas basada en la información de SITVITWEB.....	142
Tabla 7: Relación de los espoligotipos predominantes (perfiles compartidos por más de un 2 % de los aislados) en este estudio, comparándolos con los aislados de España que presentan ese mismo número SIT y su distribución geográfica en todo el mundo según la información disponible en la base de datos SITVITWEB.....	143
Tabla 8: <i>Loci</i> VNTR y secuencias de los cebadores utilizados en este estudio.	159
Tabla 9: Resultados del MLVA para los 403 aislados.	161
Tabla 10: Determinación de la diversidad alélica de cada <i>locus</i> VNTR amplificado en los 403 aislados clínicos.	167
Tabla 11: Tasa de agrupamiento y HGDI acumulado calculados con la adición sucesiva de <i>loci</i> VNTR.	167
Tabla 12: Comparación de la capacidad discriminatoria de varios métodos, o combinaciones de estos, para la caracterización molecular de aislados de <i>M. tuberculosis</i> de Extremadura.	177
Tabla 13: Grupos de aislados con idéntico perfil MLVA pero distinto espoligotipo que se dividieron al combinar el espoligotipado y el MLVA-15 <i>loci</i>	179
Tabla 14: Grupos adicionales que se dividieron al utilizar de forma conjunta el espoligotipado y el MLVA-12 <i>loci</i>	179
Tabla 15: Número de casos agrupados y no agrupados por año de aislamiento.	197
Tabla 16: Análisis bivalente de las principales variables sociodemográficas y clínicas asociadas con casos agrupados en Extremadura.	198
Tabla 17: Número de casos de TB con genotipos compartidos y únicos distribuidos por familia.	199
Tabla 18: Número de casos de TB pulmonar y extrapulmonar distribuidos por familia.....	199
Tabla 19: Relación epidemiológica entre los casos agrupados en clústeres.....	201
Tabla 20: Aislados de <i>M. tuberculosis</i> con dos alelos en algún <i>locus</i> VNTR.....	214
Tabla 21: Eventos de microevolución entre pacientes con vínculos epidemiológicos.....	215
Tabla 22: <i>Loci</i> VNTR recomendados para la caracterización molecular de <i>M. bovis</i> y que no se incluyen en el conjunto de 15 <i>loci</i> VNTR utilizado para el genotipado de aislados clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	230
Tabla 23: Perfiles MLVA encontrados en los aislados de <i>M. bovis</i> dentro de cada grupo con idéntico espoligotipo.	234
Tabla 24: Determinación de la diversidad alélica de cada <i>locus</i> VNTR amplificado en los 141 aislados de <i>M. bovis</i>	235
Tabla 25: Tasa de agrupamiento y HGDI calculados con la adición sucesiva de los <i>loci</i> VNTR analizados, así como con distintas combinaciones de estos.	235

Bibliografía

- Abadia, E.; Zhang, J.; Dos Vultos, T. *et al.* 2010. Resolving lineage assignation on *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates classified by spoligotyping with a new high-throughput 3R SNPs based method. *Infection, Genetics and Evolution*. **10** (7), 1066-1074.
- Abel, L.; El-Baghdadi, J.; Bousfiha, A.A.; Casanova, J.L. y Schurr, E. 2014. Human genetics of tuberculosis: a long and winding road. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. **369** (1645).
- Adékambi, T. y Drancourt, M. 2004. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **54** (6), 2095-2105.
- Aga, R.S.; Fair, E.; Abernethy, N.F. *et al.* 2006. Microevolution of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* in a strain prevalent in San Francisco. *Journal of Clinical Microbiology*. **44** (4), 1558-1560.
- Aguirre, J.M.; Povar, J.; Arazo, P. *et al.* 1992. Tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: apropos of 2 cases. *Anales de Medicina Interna*. **9** (5), 239-240.
- Ahmed, N.; Dobrindt, U.; Hacker, J. *et al.* 2008. Genomic fluidity and pathogenic bacteria: applications in diagnostics, epidemiology and intervention. *Nature Reviews Microbiology*. **6** (5), 387-394.
- Al-Amoud, M. 1993. The history of tuberculosis. *Saudi Medical Journal*. **14** (6), 515-520.
- Alcaide Fernández de la Vega, F.; Esteban Moreno, J.; González Martín, J. *et al.* 2005. Micobacterias. En: Cercenado, E. y Cantón, R. (eds.): *Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2ª edición, Ed. SEIMC, Madrid.
- Alcaïs, A.; Fieschi, C.; Abel, L. *et al.* 2005. Tuberculosis in children and adults: Two distinct genetic diseases. *Journal of Experimental Medicine*. **202** (12), 1617-1621.
- Alcaïs, A.; Quintana-Murci, L.; Thaler, D.S.; Schurr, E.; Abel, L. y Casanova, J. 2010. Life-threatening infectious diseases of childhood: single-gene inborn errors of immunity? *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1214** (1), 18-33.
- Alexander, K.A.; Laver, P.N.; Michel, A.L. *et al.* 2010. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. Mungi*. *Emerging Infectious Diseases*. **16** (8), 1296-1299.
- Alfayate, S.; Piñero, J.; Montero, M.T. *et al.* 2009. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Murcia. *Anales de Pediatría*. **71** (4), 327-330.
- Al-Hajoj, S.A.M.; Akkerman, O.; Parwati, I. *et al.* 2010. Microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a tuberculosis patient. *Journal of Clinical Microbiology*. **48** (10), 3813-3816.
- Alianza Alto a la Tuberculosis y Organización Mundial de la Salud. 2006. Plan Mundial para Detener la Tuberculosis 2006-2015.

- Alito, A.; Morcillo, N.; Scipioni, S. *et al.* 1999. The IS6110 restriction fragment length polymorphism in particular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains may evolve too fast for reliable use in outbreak investigation. *Journal of Clinical Microbiology*. **37** (3), 788-791.
- Alland, D.; Kalkut, G.E.; Moss, A.R. *et al.* 1994. Transmission of tuberculosis in New York City - An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *New England Journal of Medicine*. **330** (24), 1710-1716.
- Alland, D.; Whittam, T.S.; Murray, M.B. *et al.* 2003. Modeling bacterial evolution with comparative-genome-based marker systems: application to *Mycobacterium tuberculosis* evolution and pathogenesis. *Journal of Bacteriology*. **185** (11), 3392-3399.
- Alland, D.; Lacher, D.W.; Hazbón, M.H. *et al.* 2007. Role of large sequence polymorphisms (LSPs) in generating genomic diversity among clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and the utility of LSPs in phylogenetic analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. **45** (1), 39-46.
- Allix, C.; Supply, P. y Fauville-Dufaux, M. 2004. Utility of fast Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number Tandem Repeat genotyping in clinical mycobacteriological analysis. *Clinical Infectious Diseases*. **39** (6), 783-789.
- Allix, C.; Walravens, K.; Saegerman, C. *et al.* 2006. Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology*. **44** (6), 1951-1962.
- Allix-Béguet, C.; Fauville-Dufaux, M. y Supply, P. 2008a. Three-year population-based evaluation of standardized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. **46** (4), 1398-1406.
- Allix-Béguet, C.; Harmsen, D.; Weniger, T. *et al.* 2008b. 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*. **46** (8), 2692-2699.
- Allix-Béguet, C.; Wahl, C.; Hanekom, M. *et al.* 2014. Proposal of a consensus set of hypervariable mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat loci for subtyping of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. **52** (1), 164-172.
- Alonso, M.; Alonso-Rodríguez, N.; Garzelli, C. *et al.* 2010. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing isolates from the Mediterranean area. *BMC Microbiology*. **10** (51), 1-12.
- Alonso, V.; Paul, R.; Barrera, L. *et al.* 2007. False diagnosis of tuberculosis by culture. *Medicina*. **67** (3), 287-294.
- Alonso-Rodríguez, N.; Martínez-Lirola, M.; Herránz, M. *et al.* 2008. Evaluation of the new advanced 15-loci MIRU-VNTR genotyping tool in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology studies. *BMC Microbiology*. **8** (34).
- Alonso-Rodríguez, N.; Chaves, F.; Iñigo, J. *et al.* 2009a. Transmission permeability of tuberculosis involving immigrants, revealed by a multicentre analysis of clusters. *Clinical Microbiology and Infection*. **15** (5), 435-442.
- Alonso-Rodríguez, N.; Martínez-Lirola, M.; Sánchez, M.L. *et al.* 2009b. Prospective universal application of mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat genotyping to characterize *Mycobacterium tuberculosis* isolates for fast identification of clustered and orphan cases. *Journal of Clinical Microbiology*. **47** (7), 2026-2032.

- Alonso Rodríguez, N.; Martínez Lirola, M.; Chaves, F. *et al.* 2010. Differences in the robustness of clusters involving the *Mycobacterium tuberculosis* strains most frequently isolated from immigrant cases in Madrid. *Clinical Microbiology and Infection*. **16** (10), 1544-1554.
- Andersen, P. y Doherty, T.M. 2005. The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nature Reviews Microbiology*. **3** (8), 656-662.
- Andrade, M.K.N.; Machado, S.M.A.; Leite, M.L. *et al.* 2009. Phenotypic and genotypic variant of MDR-*Mycobacterium tuberculosis* multiple isolates in the same tuberculosis episode, Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **42** (5), 433-437.
- Aranaz, A.; Liébana, E.; Mateos, A. *et al.* 1998. Restriction fragment length polymorphism and spacer oligonucleotide typing: a comparative analysis of fingerprinting strategies for *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Microbiology*. **61** (4), 311-324.
- Aranaz, A.; Liébana, E.; Gómez-Mampaso, E. *et al.* 1999. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **49** (3), 1263-1273.
- Aranaz, A.; Cousins, D.; Mateos, A. *et al.* 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** (6), 1785-1789.
- Aranaz, A.; de Juan, L.; Montero, N. *et al.* 2004. Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*. **42** (6), 2602-2608.
- Arnold, C.; Thorne, N.; Underwood, A. *et al.* 2006. Evolution of short sequence repeats in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*. **256** (2), 340-346.
- Arriaza, B.T.; Salo, W.; Aufderheide, A.C. *et al.* 1995. Pre-Columbian tuberculosis in Northern Chile: molecular and skeletal evidence. *American Journal of Physical Anthropology*. **98** (1), 37-45.
- Asante-Poku, A.; Nyaho, M.S.; Borrell, S. *et al.* 2014. Evaluation of customised lineage-specific sets of MIRU-VNTR loci for genotyping *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in Ghana. *PLoS ONE*. **9** (3), e92675.
- Asiimwe, B.B.; Koivula, T.; Källenius, G. *et al.* 2008. *Mycobacterium tuberculosis* Uganda genotype is the predominant cause of TB in Kampala, Uganda. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **12** (4), 386-391.
- Ayele, W.Y.; Neill, S.D.; Zinsstag, J. *et al.* 2004. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **8** (8), 924-937.
- Baker, L.; Brown, T.; Maiden, M.C. *et al.* 2004. Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Infectious Diseases*. **10** (9), 1568-1577.
- Baker, M.G.; Lopez, L.D.; Cannon, M.C. *et al.* 2006. Continuing *Mycobacterium bovis* transmission from animals to humans in New Zealand. *Epidemiology and Infection*. **134** (5), 1068-1073.
- Baldeviano-Vidalón, G.C.; Quispe-Torres, N.; Bonilla-Asalde, C. *et al.* 2005. Multiple infection with resistant and sensitive *M. tuberculosis* strains during treatment of pulmonary tuberculosis patients. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **9** (10), 1155-1160.
- Balmer, O. y Tanner, M. 2011. Prevalence and implications of multiple-strain infections. *The Lancet Infectious Diseases*. **11** (11), 868-878.

- Bandera, A.; Gori, A.; Catozzi, L. *et al.* 2001. Molecular epidemiology study of exogenous reinfection in an area with a low incidence of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. **39** (6), 2213-2218.
- Bang, D.; Andersen, A.B.; Thomsen, V.O. *et al.* 2010. Recurrent tuberculosis in Denmark: Relapse vs. re-infection. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **14** (4), 447-453.
- Barksdale, L. y Kim, K.S. 1977. Mycobacterium. *Bacteriological Reviews*. **41** (1), 217-372.
- Barlow, R.E.L.; Gascoyne-Binzi, D.M.; Gillespie, S.H. *et al.* 2001. Comparison of variable number tandem repeat and IS6110-restriction fragment length polymorphism analyses for discrimination of high- and low-copy-number IS6110 *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. **39** (7), 2453-2457.
- Barnes, D.S. 2000. Historical perspective on the etiology of tuberculosis. *Microbes and Infection*. **2** (4), 431-440.
- Barnes, P.F. y Cave, M.D. 2003. Molecular epidemiology of tuberculosis. *New England Journal of Medicine*. **349** (12), 1149-1156.
- Barniol, J.; Niemann, S.; Louis, V.R. *et al.* 2009. Transmission dynamics of pulmonary tuberculosis between autochthonous and immigrant sub-populations. *BMC Infectious Diseases*. **9** (197).
- Barry III, C.E. 2001. Interpreting cell wall "virulence factors" of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Microbiology*. **9** (5), 237-241.
- Barry III, C.E.; Boshoff, H.I.; Dartois, V. *et al.* 2009. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nature Reviews Microbiology*. **7** (12), 845-855.
- Basaraba, R.J. 2008. Experimental tuberculosis: the role of comparative pathology in the discovery of improved tuberculosis treatment strategies. *Tuberculosis*. **88** (SUPPL. 1), S35-S47.
- Bastida, R.; Quse, V. y Guichón, R. 2011. La tuberculosis en grupos de cazadores recolectores de Patagonia y Tierra del Fuego: nuevas alternativas de contagio a través de la fauna silvestre. *Revista Argentina de Antropología Biológica*. **13** (1), 83-95.
- Bauer, J.; Andersen, Å.B.; Kremer, K. *et al.* 1999. Usefulness of spoligotyping to discriminate IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark. *Journal of Clinical Microbiology*. **37** (8), 2602-2606.
- Bauer, J.; Thomsen, V.Ø.; Poulsen, S. *et al.* 1997. False-positive results from cultures of *Mycobacterium tuberculosis* due to laboratory cross-contamination confirmed by restriction fragment length polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology*. **35** (4), 988-991.
- Behr, M.A.; Hopewell, P.C.; Paz, E.A. *et al.* 1998. Predictive value of contact investigation for identifying recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **158** (2), 465-469.
- Behr, M.A.; Warren, S.A.; Salamon, H. *et al.* 1999. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet*. **353** (9151), 444-449.
- Behr, M.A. y Mostowy, S. 2007. Molecular tools for typing and branding the tubercle bacillus. *Current Molecular Medicine*. **7** (3), 309-317.
- Bello, S.; Signoli, M. y Dutour, O. 2000. Tuberculosis mortality in France from the 18th to 20th century. *Medicine et Maladies Infectieuses*. **30** (5), 275-283.

- Benedetti, A.; Menzies, D.; Behr, M.A. *et al.* 2010. How close is close enough? Exploring matching criteria in the estimation of recent transmission of tuberculosis. *American Journal of Epidemiology*. **172** (3), 318-326.
- Bergey, D.H. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2ª ed. Springer, New York. Págs. 304.
- Bespyatykh, J.A.; Zimenkov, D.V.; Shitikov, E.A. *et al.* 2014. Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates using hydrogel oligonucleotide microarrays. *Infection, Genetics and Evolution*. **26** 41-46.
- Bhattacharya, M.; Dietrich, S.; Mosher, L. *et al.* 1998. Cross-contamination of specimens with *Mycobacterium tuberculosis*: clinical significance, causes, and prevention. *American Journal of Clinical Pathology*. **109** (3), 324-330.
- Blackwood, K.S.; Wolfe, J.N. y Kabani, A.M. 2004. Application of mycobacterial interspersed repetitive unit typing to Manitoba tuberculosis cases: can restriction fragment length polymorphism be forgotten? *Journal of Clinical Microbiology*. **42** (11), 5001-5006.
- Blaser, M.J. y Kirschner, D. 2007. The equilibria that allow bacterial persistence in human hosts. *Nature*. **449** (7164), 843-849.
- Blázquez, J.; Espinosa de los Monteros, L.E.; Samper, S. *et al.* 1997. Genetic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus- positive patients. *Journal of Clinical Microbiology*. **35** (6), 1390-1393.
- Bloom, B.R. y Murray, C.J.L. 1992. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science*. **257** (5073), 1055-1064.
- Böddinghaus, B.; Rogall, T.; Flohr, T. *et al.* 1990. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *Journal of Clinical Microbiology*. **28** (8), 1751-1759.
- Boniotti, M.B.; Goria, M.; Loda, D. *et al.* 2009. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of variable-number tandem repeats for geographically optimized genotyping. *Journal of Clinical Microbiology*. **47** (3), 636-644.
- Borgdorff, M.W.; van Deutekom, H.; De Haas, P.E.W. *et al.* 2004. *Mycobacterium tuberculosis*, Beijing genotype strains not associated with radiological presentation of pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*. **84** (5), 337-340.
- Borgdorff, M.W.; van der Werf, M.J.; de Haas, P.E.W. *et al.* 2005. Tuberculosis elimination in the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*. **11** (4), 597-602.
- Borgdorff, M.W. y van Soolingen, D. 2013. The re-emergence of tuberculosis: What have we learnt from molecular epidemiology? *Clinical Microbiology and Infection*. **19** (10), 889-901.
- Borrell, S.; Español, M.; Orcau, À. *et al.* 2009. Factors associated with differences between conventional contact tracing and molecular epidemiology in study of tuberculosis transmission and analysis in the city of Barcelona, Spain. *Journal of Clinical Microbiology*. **47** (1), 198-204.
- Borrell, S.; Español, M.; Orcau, T. *et al.* 2010. Tuberculosis transmission patterns among Spanish-born and foreign-born populations in the city of Barcelona. *Clinical Microbiology and Infection*. **16** (6), 568-574.
- Bos, K.I.; Harkins, K.M.; Herbig, A. *et al.* 2014. Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. *Nature*. **514** (7523), 494-497.

- Braden, C.R.; Templeton, G.L.; Donald Cave, M. *et al.* 1997a. Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a state with a large rural population. *Journal of Infectious Diseases*. **175** (6), 1446-1452.
- Braden, C.R.; Templeton, G.L.; Stead, W.W. *et al.* 1997b. Retrospective detection of laboratory cross-contamination of *Mycobacterium tuberculosis* cultures with use of DNA fingerprint analysis. *Clinical Infectious Diseases*. **24** (1), 35-40.
- Brändli, O. 1998. The clinical presentation of tuberculosis. *Respiration*. **65** (2), 97-105.
- Braun, M.; Cook, D.C. y Pfeiffer, S. 1998. DNA from *Mycobacterium tuberculosis* complex identified in North American, pre-Columbian human skeletal remains. *Journal of Archaeological Science*. **25** (3), 271-277.
- Brennan, P.J. y Nikaido, H. 1995. The envelope of mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry*. **64**, 29-63.
- Brennan, P.J. 2003. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. **83** (1-3), 91-97.
- Brisse, S.; Supply, P.; Brosch, R. *et al.* 2006. "A re-evaluation of *M. prototuberculosis*": continuing the debate. *PLoS Pathogens*. **2** (9), e95.
- Brosch, R.; Gordon, S.V.; Marmiesse, M. *et al.* 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.
- Brown, T.; Nikolayevskyy, V.; Velji, P. *et al.* 2010. Associations between *Mycobacterium tuberculosis* strains and phenotypes. *Emerging Infectious Diseases*. **16** (2), 272-280.
- Brudey, K.; Gutiérrez, M.C.; Vincent, V. *et al.* 2004. *Mycobacterium africanum* genotyping using novel spacer oligonucleotides in the direct repeat locus. *Journal of Clinical Microbiology*. **42** (11), 5053-5057.
- Brudey, K.; Driscoll, J.R.; Rigouts, L. *et al.* 2006. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiology*. **6**.
- Bryant, J.M.; Harris, S.R.; Parkhill, J. *et al.* 2013a. Whole-genome sequencing to establish relapse or reinfection with *Mycobacterium tuberculosis*: a retrospective observational study. *The Lancet Respiratory Medicine*. **1** (10), 786-792.
- Bryant, J.M.; Schürch, A.C.; van Deutekom, H. *et al.* 2013b. Inferring patient to patient transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from whole genome sequencing data. *BMC Infectious Diseases*. **13** (110), 1-12.
- Burman, W.J.; Stone, B.L.; Reves, R.R. *et al.* 1997. The incidence of false-positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **155** (1), 321-326.
- Burman, W.J. y Reves, R.R. 2000. Review of false-positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis* and recommendations for avoiding unnecessary treatment. *Clinical Infectious Diseases*. **31** (6), 1390-1395.
- Cacho Calvo, J.; Astray Mochales, J.; Pérez Meixeira, A. *et al.* 2005. Ten-year population-based molecular epidemiological study of tuberculosis transmission in the metropolitan area of Madrid, Spain. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **9** (11), 1236-1241.

- Cacho, J.; Pérez Meixeira, A.; Cano, I. *et al.* 2007. Recurrent tuberculosis from 1992 to 2004 in a metropolitan area. *European Respiratory Journal*. **30** (2), 333-337.
- Caimi, K.; Romano, M.I.; Alito, A. *et al.* 2001. Sequence analysis of the direct repeat region in *Mycobacterium bovis*. *Journal of Clinical Microbiology*. **39** (3), 1067-1072.
- Caminero, J.A.; Pena, M.J.; Campos-Herrero, M.I. *et al.* 2001. Exogenous reinfection with tuberculosis on a European Island with a moderate incidence of disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **163** (3 I), 717-720.
- Canci, A.; Minozzi, S.; Silvana, M. *et al.* 1996. New evidence of tuberculous spondylitis from Neolithic Liguria (Italy). *International Journal of Osteoarchaeology*. **6** (5), 497-501.
- Cardona, P.J. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens*, a long way to cross. *Medicina Clínica*. **126** (20), 771-773.
- Cardona, P.J. 2009. A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection. *Infection*. **37** (2), 80-86.
- Cardoso-Oelemann, M.; Gomes, H.M.; Willery, E. *et al.* 2011. The forest behind the tree: Phylogenetic exploration of a dominant *Mycobacterium tuberculosis* strain lineage from a high tuberculosis burden country. *PLoS ONE*. **6** (3), e18256.
- Castets, M.; Boisvert, H.; Grumbach, F. *et al.* 1968. Tuberculosis bacilli of the African type: preliminary note. *Revue de Tuberculose et de Pneumologie*. **32** (2), 179-184.
- Castets, M.; Rist, N. y Boisvert, H. 1969. La variété africaine du bacille tuberculeux humain. *Médecine d'Afrique Noire*. **16** 321-322.
- Cave, M.D.; Eisenach, K.D.; McDermott, P.F. *et al.* 1991. IS6110: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. *Molecular and Cellular Probes*. **5** (1), 73-80.
- Caws, M.; Thwaites, G.; Dunstan, S. *et al.* 2008. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens*. **4** (3), e1000034.
- Centro Nacional de Epidemiología e Instituto de Salud Carlos III. 2013. Informe epidemiológico sobre la situación de la tuberculosis en España. Año 2012.
- Chaoui, I.; Zozio, T.; Lahlou, O. *et al.* 2014. Contribution of spoligotyping and MIRU-VNTRs to characterize prevalent *Mycobacterium tuberculosis* genotypes infecting tuberculosis patients in Morocco. *Infection, Genetics and Evolution*. **21**, 463-471.
- Chin, D.P.; DeRiemer, K.; Small, P.M. *et al.* 1998. Differences in contributing factors to tuberculosis incidence in U.S.- born and foreign-born persons. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **158** (6), 1797-1803.
- Click, E.S.; Moonan, P.K.; Winston, C.A. *et al.* 2012. Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* phylogenetic lineage and clinical site of tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*. **54** (2), 211-219.
- Cobo, J.; Asensio, A.; Moreno, S. *et al.* 2001. Risk factors for nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* among HIV-infected patients. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **5** (5), 413-418.
- Cockburn, T.A. 1963. The evolution and eradication of infectious disease. 1^a ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

- Codina, G.; Vidal, R.; Martin-Casabona, N. *et al.* 1999. Multidrug-resistant tuberculosis caused by 'W'-related strains in three immunocompetent foreign-born patients. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **3** (1), 82-83.
- Cohan, F.M. 2002. What are bacterial species? *Annual Review of Microbiology*. **56** 457-487.
- Cohen, T.; van Helden, P.D.; Wilson, D. *et al.* 2012. Mixed-strain *Mycobacterium tuberculosis* infections and the implications for tuberculosis treatment and control. *Clinical Microbiology Reviews*. **25** (4), 708-719.
- Cohnheim, J.F. y Salomonsen, C.J. 1877. Versuche über künstliche Tuberkulose. *Jahres-Bericht der Schlesische Gesellschaft für vaterländische Cultur*. **55**, 222f.
- Colangeli, R.; Arcus, V.L.; Cursons, R.T. *et al.* 2014. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* reveals slow growth and low mutation rates during latent infections in humans. *PLoS ONE*. **9** (3), e91024.
- Cole, S.T.; Brosch, R.; Parkhill, J. *et al.* 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. **393** (6685), 537-544.
- Colijn, C.; Cohen, T. y Murray, M. 2009. Latent coinfection and the maintenance of strain diversity. *Bulletin of Mathematical Biology*. **71** (1), 247-263.
- Coll, F.; McNerney, R.; Guerra-Assunção, J.A. *et al.* 2014. A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Nature Communications*. **5** 4812.
- Collins, D.M. y de Lisle, G.W. 1984. DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of General Microbiology*. **130** (4), 1019-1021.
- Collins, D.M. 1985. DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium bovis* and other members of the tuberculosis complex. *Journal of Clinical Microbiology*. **21** (4), 562-564.
- Collins, D.M. 1987. BCG identification by DNA restriction fragment patterns. *Journal of General Microbiology*. **133** (6), 1431-1434.
- Collins, D.M.; Erasmuson, S.K.; Stephens, D.M. *et al.* 1993. DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* strains by restriction fragment analysis and hybridization with insertion elements IS1081 and IS6110. *Journal of Clinical Microbiology*. **31** (5), 1143-1147.
- Colmenero, J.D.; Sanjuan-Jimenez, R.; Ramos, B. *et al.* 2012. Miliary pulmonary tuberculosis following intravesical BCG therapy: case report and literature review. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **74** (1), 70-72.
- Comas, I.; Homolka, S.; Niemann, S. *et al.* 2009. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *PLoS ONE*. **4** (11), e7815.
- Comas, I.; Chakravarti, J.; Small, P.M. *et al.* 2010. Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved. *Nature Genetics*. **42** (6), 498-503.
- Comas, I.; Borrell, S.; Roetzer, A. *et al.* 2012. Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes. *Nature Genetics*. **44** (1), 106-110.
- Comas, I.; Coscolla, M.; Luo, T. *et al.* 2013. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nature genetics*. **45** (10), 1176-1182.

- Cooper, A.M. 2009. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annual Review of Immunology*. **27** 393-422.
- Copin, R.; Coscolla, M.; Efstathiadis, E. *et al.* 2014. Impact of in vitro evolution on antigenic diversity of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG). *Vaccine*. **32** (45), 5998-6004.
- Coscolla, M. y Gagneux, S. 2010. Does *M. tuberculosis* genomic diversity explain disease diversity? *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. **7** (1), e43-e59.
- Coscolla, M.; Lewin, A.; Metzger, S. *et al.* 2013. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex isolate from a wild chimpanzee. *Emerging Infectious Diseases*. **19** (6), 969-976.
- Coscolla, M. 2014. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Seminars in Immunology*. **26** (6), 431-444.
- Costello, E.; O'Grady, D.; Flynn, O. *et al.* 1999. Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of *Mycobacterium bovis* infection. *Journal of Clinical Microbiology*. **37** (10), 3217-3222.
- Cousins, D.V.; Williams, S.N.; Reuter, R. *et al.* 1993. Tuberculosis in wild seals and characterisation of the seal bacillus. *Australian Veterinary Journal*. **70** (3), 92-97.
- Cousins, D.V. y Dawson, D.J. 1999. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the Australian population: Cases recorded during 1970-1994. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **3** (8), 715-721.
- Cousins, D.V.; Bastida, R.; Cataldi, A. *et al.* 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **53** (5), 1305-1314.
- Coussens, A.K.; Wilkinson, R.J.; Nikolayevskyy, V. *et al.* 2013. Ethnic variation in inflammatory profile in tuberculosis. *PLoS Pathogens*. **9** (7), e1003468.
- Cowan, L.S.; Mosher, L.; Diem, L. *et al.* 2002. Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. *Journal of Clinical Microbiology*. **40** (5), 1592-1602.
- Cowan, L.S.; Diem, L.; Brake, M.C. *et al.* 2004. Transfer of a *Mycobacterium tuberculosis* genotyping method, Spoligotyping, from a Reverse Line-Blot Hybridization, membrane-based assay to the Luminex Multianalyte Profiling System. *Journal of Clinical Microbiology*. **42** (1), 474-477.
- Cowan, L.S.; Diem, L.; Monson, T. *et al.* 2005. Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*. **43** (2), 688-695.
- Cox, H.S.; Sibia, K.; Feuerriegel, S. *et al.* 2008. Emergence of extensive drug resistance during treatment for multidrug-resistant tuberculosis. *New England Journal of Medicine*. **359** (22), 2398-2400.
- Crampin, A.C.; Mwaungulu, J.N.; Mwaungulu, F.D. *et al.* 2010. Recurrent TB: relapse or reinfection? The effect of HIV in a general population cohort in Malawi. *AIDS*. **24** (3), 417-426.
- Cronin, W.A.; Golub, J.E.; Magder, L.S. *et al.* 2001. Epidemiologic usefulness of spoligotyping for secondary typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110. *Journal of Clinical Microbiology*. **39** (10), 3709-3711.

- Crubézy, E.; Ludes, B.; Poveda, J.D. *et al.* 1998. Identification of *Mycobacterium* DNA in an Egyptian Pott's disease of 5400 years old. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Serie III.* **321** (11), 941-951.
- Cruz, A.T. y Starke, J.R. 2007. Clinical manifestations of tuberculosis in children. *Paediatric Respiratory Reviews.* **8** (2), 107-117.
- Cunha, M.V.; Matos, F.; Canto, A. *et al.* 2012. Implications and challenges of tuberculosis in wildlife ungulates in Portugal: a molecular epidemiology perspective. *Research in Veterinary Science.* **92** (2), 225-235.
- Daffé, M. y Draper, P. 1998. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Advances in Microbial Physiology.* **39** 131-203.
- Daffé, M. y Etienne, G. 1999. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tubercle and Lung Disease.* **79** (3), 153-169.
- Dale, J.W.; Brittain, D.; Cataldi, A.A. *et al.* 2001. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardised nomenclature. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease.* **5** (3), 216-219.
- Daley, C.L.; Small, P.M.; Schechter, G.F. *et al.* 1991. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus: an analysis using restriction-fragment-length polymorphisms. *New England Journal of Medicine.* **326** (4), 231-235.
- Daley, C.L. 2005. Molecular epidemiology: a tool for understanding control of tuberculosis transmission. *Clinics in Chest Medicine.* **26** (2), 217-231.
- Daniel, T.M. 2000. The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: Can we figure them out? *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease.* **4** (5), 395-400.
- Daniel, T.M. 2005. Robert Koch and the pathogenesis of tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease.* **9** (11), 1181-1182.
- Daniel, T.M. 2006. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine.* **100** (11), 1862-1870.
- Darling, M.I. y Donoghue, H.D. 2014. Insights from paleomicrobiology into the indigenous peoples of pre-colonial America - A Review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* **109** (2), 131-139.
- Davey, M.E. y O'Toole, G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **64** (4), 847-867.
- David, S.; Ribeiro, D.R.; Antunes, A. *et al.* 2007. Contribution of spoligotyping to the characterization of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. *Infection, Genetics and Evolution.* **7** (5), 609-617.
- Davis, J.M.; Clay, H.; Lewis, J.L. *et al.* 2002. Real-time visualization of *Mycobacterium*-macrophage interactions leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos. *Immunity.* **17** (6), 693-702.
- Davis, J.M. y Ramakrishnan, L. 2009. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell.* **136** (1), 37-49.
- de Beer, J.L.; Kremer, K.; Ködmön, C. *et al.* 2012. First worldwide proficiency study on variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Journal of Clinical Microbiology.* **50** (3), 662-669.

- de Beer, J.L.; van Ingen, J.; de Vries, G. *et al.* 2013. Comparative study of IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism and Variable-Number Tandem-Repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the Netherlands, based on a 5-year nationwide survey. *Journal of Clinical Microbiology*. **51** (4), 1193-1198.
- de Beer, J.L.; Ködmön, C.; van Ingen, J. *et al.* 2014. Second worldwide proficiency study on variable number of tandem repeats typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **18** (5), 594-600+i.
- de Benito, J.; de March, P.; Balfagón, P. *et al.* 2005. Bovine tuberculosis in Spain. *Medicina Clínica*. **125** (12), 475.
- de Boer, A.S.; Blommerde, B.; de Haas, P.E.W. *et al.* 2002. False-positive *Mycobacterium tuberculosis* cultures in 44 laboratories in The Netherlands (1993 to 2000): incidence, risk factors, and consequences. *Journal of Clinical Microbiology*. **40** (11), 4004-4009.
- de Bruyn, G.; Adams, G.J.; Teeter, L.D. *et al.* 2001. The contribution of ethnicity to *Mycobacterium tuberculosis* strain clustering. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **5** (7), 633-641.
- de Jong, B.C.; Hill, P.C.; Aiken, A. *et al.* 2008. Progression to active tuberculosis, but not transmission, varies by *Mycobacterium tuberculosis* lineage in the Gambia. *Journal of Infectious Diseases*. **198** (7), 1037-1043.
- de Jong, B.C.; Antonio, M.; Awine, T.; Ogungbemi, K.; de Jong, Y.P.; Gagneux, S. *et al.* 2009. Use of spoligotyping and large sequence polymorphisms to study the population structure of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in a cohort study of consecutive smear-positive tuberculosis cases in the Gambia. *Journal of Clinical Microbiology*. **47** (4), 994-1001.
- de Juan, F. 2010. Linfadenitis tuberculosa por *Mycobacterium bovis*. *Boletín de la Sociedad de Pediatría de Aragón, La Rioja y Soria*. **40** (2), 40-42.
- de la Rua-Domenech, R. 2006. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis*. **86** (2), 77-109.
- Demay, C.; Liens, B.; Burguière, T. *et al.* 2012. SITVITWEB - A publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*. **12** (4), 755-766.
- Diaz, R.; Kremer, K.; de Haas, P.E.W. *et al.* 1998. Molecular epidemiology of tuberculosis in Cuba outside of Havana, July 1994-June 1995: utility of spoligotyping versus IS6110 restriction fragment length polymorphism. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **2** (9), 743-750.
- Diel, R.; Schneider, S.; Meywald-Walter, K. *et al.* 2002. Epidemiology of tuberculosis in Hamburg, Germany: Long-term population-based analysis applying classical and molecular epidemiological techniques. *Journal of Clinical Microbiology*. **40** (2), 532-539.
- Diel, R.; Meywald-Walter, K.; Gottschalk, R. *et al.* 2004. Ongoing outbreak of tuberculosis in a low-incidence community: a molecular-epidemiological evaluation. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **8** (7), 855-861.
- Djelouadji, Z.; Raoult, D. y Drancourt, M. 2011. Palaeogenomics of *Mycobacterium tuberculosis*: epidemic bursts with a degrading genome. *The Lancet Infectious Diseases*. **11** (8), 641-650.
- Dobler, C.C.; Crawford, A.B.H.; Jelfs, P.J. *et al.* 2009. Recurrence of tuberculosis in a low-incidence setting. *European Respiratory Journal*. **33** (1), 160-167.

- Doetsch, R.N. 1978. Benjamin Marten and his "New theory of consumptions". *Microbiological Reviews*. **42** (3), 521-528.
- Domínguez Rodríguez, L. y Bezos Garrido, J. 2014. Tuberculosis. Una enfermedad compartida entre el hombre y los animales. Catarata, Madrid. Págs. 117.
- Donoghue, H.D.; Spigelman, M.; Zias, J. *et al.* 1998. *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA in calcified pleura from remains 1400 years old. *Letters in Applied Microbiology*. **27** (5), 265-269.
- Donoghue, H.D. 2011. Insights gained from palaeomicrobiology into ancient and modern tuberculosis. *Clinical Microbiology and Infection*. **17** (6), 821-829.
- Dos Vultos, T.; Mestre, O.; Rauzier, J. *et al.* 2008. Evolution and diversity of clonal bacteria: the paradigm of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE*. **3** (2), e1538.
- Drancourt, M. y Raoult, D. 2005. Palaeomicrobiology: current issues and perspectives. *Nature Reviews Microbiology*. **3** (1), 23-35.
- du Plessis, D.G.; Warren, R.; Richardson, M. *et al.* 2001. Demonstration of reinfection and reactivation in HIV-negative autopsied cases of secondary tuberculosis: multilesional genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* utilizing IS6110 and other repetitive element-based DNA fingerprinting. *Tuberculosis*. **81** (3), 211-220.
- Duarte, E.L.; Domingos, M.; Amado, A. *et al.* 2008. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. *Veterinary Microbiology*. **130** (3-4), 415-421.
- Duarte, E.L.; Domingos, M.; Amado, A. *et al.* 2010. MIRU-VNTR typing adds discriminatory value to groups of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* strains defined by spoligotyping. *Veterinary Microbiology*. **143** (2-4), 299-306.
- Duncan, K. 2003. Progress in TB drug development and what is still needed. *Tuberculosis*. **83** (1-3), 201-207.
- Dye, C.; Scheele, S.; Dolin, P. *et al.* 1999. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. *Journal of the American Medical Association*. **282** (7), 677-686.
- Eilertson, B.; Maruri, F.; Blackman, A. *et al.* 2014. High proportion of heteroresistance in *gyrA* and *gyrB* in fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **58** (6), 3270-3275.
- Eisenach, K.D.; Crawford, J.T. y Bates, J.H. 1986. Genetic relatedness among strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Analysis of restriction fragment heterogeneity using cloned DNA probes. *American Review of Respiratory Disease*. **133** (6), 1065-1068.
- Eisenach, K.D. 1988. Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. **26** (11), 2240-2245.
- Elizaga, J.; Carrero, P.; Íñigo, J. *et al.* 2002. Recent transmission of tuberculosis in an area with low incidence: epidemiological and molecular study. *Medicina Clínica*. **118** (17), 645-649.
- Esmail, H.; Barry III, C.E. y Wilkinson, R.J. 2012. Understanding latent tuberculosis: the key to improved diagnostic and novel treatment strategies. *Drug Discovery Today*. **17** (9-10), 514-521.
- Esmail, H.; Barry III, C.E.; Young, D.B. *et al.* 2014. The ongoing challenge of latent tuberculosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. **369** (1645),

- Esteban, J.; Robles, P.; Soledad-Jiménez, M. *et al.* 2005. Pleuropulmonary infections caused by *Mycobacterium bovis*: a re-emerging disease. *Clinical Microbiology and Infection*. **11** (10), 840-843.
- Etchechoury, I.; Valencia, G.E.; Morcillo, N. *et al.* 2010. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates in Argentina: first description of a person-to-person transmission case. *Zoonoses and Public Health*. **57** (6), 375-381.
- European Centre for Disease Prevention and Control y WHO Regional Office for Europe 2013. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2013.
- Euzéby, J.P. 2014. *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus Mycobacterium* (sitio web). French 22-05-2014. (Consulta: 2014/08/23). Disponible en: <http://www.bacterio.net/m/mycobacterium.html>.
- Evans, J.T.; Smith, E.G.; Banerjee, A. *et al.* 2007. Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. *Lancet*. **369** (9569), 1270-1276.
- Evans, J.T.; Gardiner, S.; Smith, E.G. *et al.* 2010. Global origin of *Mycobacterium tuberculosis* in the Midlands, UK. *Emerging Infectious Diseases*. **16** (3), 542-545.
- Fabre, M.; Hauck, Y.; Soler, C. *et al.* 2010. Molecular characteristics of "*Mycobacterium canettii*" the smooth *Mycobacterium tuberculosis* bacilli. *Infection, Genetics and Evolution*. **10** (8), 1165-1173.
- Fang, Z.; Morrison, N.; Watt, B. *et al.* 1998. IS6110 transposition and evolutionary scenario of the direct repeat locus in a group of closely related *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Journal of Bacteriology*. **180** (8), 2102-2109.
- Farnia, P.; Mohammadi, F.; Masjedi, M.R. *et al.* 2004. Evaluation of tuberculosis transmission in Tehran: using RFLP and spoligotyping methods. *Journal of Infection*. **49** (2), 94-101.
- Feizabadi, M.M.; Robertson, I.D.; Cousins, D.V. *et al.* 1996. Genomic analysis of *Mycobacterium bovis* and other members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by isoenzyme analysis and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*. **34** (5), 1136-1142.
- Feizabadi, M.M.; Robertson, I.D.; Edwards, R. *et al.* 1997. Genetic differentiation of Australian isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Medical Microbiology*. **46** (6), 501-505.
- Feldman, W.H.; Hinshaw, H.C. y Mann, F.C. 1945. Streptomycin in experimental tuberculosis. *American Review of Tuberculosis*. **52** 269-298.
- Fenner, L.; Malla, B.; Ninet, B. *et al.* 2011. "Pseudo-Beijing": Evidence for convergent evolution in the direct repeat region of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE*. **6** (9), e24737.
- Ferlinz, R. 1995. Die tuberkulose in Deutschland und das Deutsche Zentralkomitee zur bekämpfung der tuberkulose. *Pneumologie*. **49** (3), 617-632.
- Feuerriegel, S.; Köser, C.U. y Niemann, S. 2014. Phylogenetic polymorphisms in antibiotic resistance genes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **69** (5), 1205-1210.
- Filliol, I.; Ferdinand, S.; Negroni, L. *et al.* 2000. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* based on variable number of tandem DNA repeats used alone and in association with spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology*. **38** (7), 2520-2524.

- Fillioli, I.; Driscoll, J.R.; van Soolingen, D. *et al.* 2002. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerging Infectious Diseases*. **8** (11), 1347-1349.
- Fillioli, I.; Driscoll, J.R.; van Soolingen, D. *et al.* 2003. Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. *Journal of Clinical Microbiology*. **41** (5), 1963-1970.
- Fillioli, I.; Motiwala, A.S.; Cavatore, M. *et al.* 2006. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *Journal of Bacteriology*. **188** (2), 759-772.
- Fine, P.E.M. 2001. BCG: The challenge continues. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. **33** (4), 243-245.
- Firdessa, R.; Berg, S.; Hailu, E. *et al.* 2013. Mycobacterial lineages causing pulmonary and extrapulmonary tuberculosis, Ethiopia. *Emerging Infectious Diseases*. **19** (3), 460-463.
- Fitzpatrick, L.K.; Hardacker, J.A.; Heirendt, W. *et al.* 2001. A preventable outbreak of tuberculosis investigated through an intricate social network. *Clinical Infectious Diseases*. **33** (11), 1801-1806.
- Fleischmann, R.D.; Alland, D.; Eisen, J.A. *et al.* 2002. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *Journal of Bacteriology*. **184** (19), 5479-5490.
- Flores, L.; Van, T.; Narayanan, S. *et al.* 2007. Large sequence polymorphisms classify *Mycobacterium tuberculosis* strains with ancestral spoligotyping patterns. *Journal of Clinical Microbiology*. **45** (10), 3393-3395.
- Flynn, J.L.; Goldstein, M.M.; Chan, J. *et al.* 1995. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*. **2** (6), 561-572.
- Flynn, J.L. y Chan, J. 2001. Immunology of tuberculosis. *Annual Review of Immunology*. **19** 93-129.
- Fok, A.; Numata, Y.; Schulzer, M. *et al.* 2008. Risk factors for clustering of tuberculosis cases: a systematic review of population-based molecular epidemiology studies. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **12** (5), 480-492.
- Fonseca-Capdevila, E. 2011. Atypical mycobacterial cutaneous infections in children. *Piel*. **26** (6), 278-284.
- Ford, C.B.; Lin, P.L.; Chase, M.R. *et al.* 2011. Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection. *Nature Genetics*. **43** (5), 482-488.
- Ford, C.; Yusim, K.; Ioerger, T. *et al.* 2012. *Mycobacterium tuberculosis* - Heterogeneity revealed through whole genome sequencing. *Tuberculosis*. **92** (3), 194-201.
- Formicola, V.; Milanesi, Q. y Scarsini, C. 1987. Evidence of spinal tuberculosis at the beginning of the fourth millennium BC from Arene Candide cave (Liguria, Italy). *American Journal of Physical Anthropology*. **72** (1), 1-6.
- Franco-Paredes, C.; Roupheal, N.; del Rio, C. *et al.* 2006. Vaccination strategies to prevent tuberculosis in the new millennium: from BCG to new vaccine candidates. *International Journal of Infectious Diseases*. **10** (2), 93-102.
- Fraser, C.; Hollingsworth, T.D.; Chapman, R. *et al.* 2007. Variation in HIV-1 set-point viral load: epidemiological analysis and an evolutionary hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **104** (44), 17441-17446.

- Frieden, T.R.; Woodley, C.L.; Crawford, J.T. *et al.* 1996. The molecular epidemiology of tuberculosis in New York City: the importance of nosocomial transmission and laboratory error. *Tubercle and Lung Disease*. **77** (5), 407-413.
- Frothingham, R. y Meeker-O'Connell, W.A. 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology*. **144** (5), 1189-1196.
- Gagneux, S.; DeRiemer, K.; Van, T. *et al.* 2006. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **103** (8), 2869-2873.
- Gagneux, S. y Small, P.M. 2007. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infectious Diseases*. **7** (5), 328-337.
- Gagneux, S. 2012. Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. **367** (1590), 850-859.
- Galili, E.; Rosen, B.; Gopher, A. *et al.* 2002. The emergence and dispersion of the Eastern Mediterranean fishing village: evidence from submerged neolithic settlements off the Carmel Coast, Israel. *Journal of Mediterranean Archaeology*. **15** (2), 167-198.
- García de Viedma, D.; Marín, M.; Ruiz Serrano, M.J. *et al.* 2003. Polyclonal and compartmentalized infection by *Mycobacterium tuberculosis* in patients with both respiratory and extrapulmonary involvement. *Journal of Infectious Diseases*. **187** (4), 695-699.
- García de Viedma, D.; Alonso Rodríguez, N.; Andrés, S. *et al.* 2005a. Characterization of clonal complexity in tuberculosis by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing. *Journal of Clinical Microbiology*. **43** (11), 5660-5664.
- García de Viedma, D.; Bouza, E.; Rastogi, N. *et al.* 2005b. Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in Madrid and identification of two new families specific to Spain-related settings. *Journal of Clinical Microbiology*. **43** (4), 1797-1806.
- García de Viedma, D.; Chaves, F. y Iñigo, J. 2006a. New route of importation of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype. *Emerging Infectious Diseases*. **12** (1), 169-170.
- García de Viedma, D.; Marín, M.; Andrés, S. *et al.* 2006b. Complex clonal features in an *Mycobacterium tuberculosis* infection in a two-year-old child. *Pediatric Infectious Disease Journal*. **25** (5), 457-459.
- García de Viedma, D.; Marín, M.; Hernangómez, S. *et al.* 2002. Tuberculosis recurrences: reinfection plays a role in a population whose clinical/epidemiological characteristics do not favor reinfection. *Archives of Internal Medicine*. **162** (16), 1873-1879.
- García de Viedma, D.; Mokrousov, I. y Rastogi, N. 2011. Innovations in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. **29** (SUPPL. 1), 8-13.
- García-Betancur, J.C.; Menéndez, M.C.; del Portillo, P. *et al.* 2012. Alignment of multiple complete genomes suggests that gene rearrangements may contribute towards the speciation of *Mycobacteria*. *Infection, Genetics and Evolution*. **12** (4), 819-826.
- García-Jiménez, W.L. 2013. Tuberculosis bovina en especies silvestres: indicadores histopatológicos y moleculares útiles para el diseño de medidas de control. *Tesis doctoral*.
- García-Jiménez, W.L.; Fernández-Llario, P.; Benítez-Medina, J.M. *et al.* 2013. Reducing Eurasian wild boar (*Sus scrofa*) population density as a measure for bovine tuberculosis control: effects in wild boar and a sympatric fallow deer (*Dama dama*) population in Central Spain. *Preventive Veterinary Medicine*. **110** (3-4), 435-446.

- García-Pachón, E. y Rodríguez, J.C. 2005. Molecular epidemiology of tuberculosis: main findings and their application in Spain. *Archivos de Bronconeumología*. **41** (11), 618-624.
- Gardy, J.L.; Johnston, J.C.; Ho Sui, S.J. *et al.* 2011. Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak. *New England Journal of Medicine*. **364** (8), 730-739.
- Garnier, T.; Eiglmeier, K.; Camus, J.C. *et al.* 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **100** (13), 7877-7882.
- Garrigó, M.; Aragón, L.M.; Alcaide, F. *et al.* 2007. Multicenter laboratory evaluation of the MB/BacT *Mycobacterium* detection system and the BACTEC MGIT 960 system in comparison with the BACTEC 460TB system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. **45** (6), 1766-1770.
- Gavín, P.; Iglesias, M.J.; Jiménez, M.S. *et al.* 2012. Long-term molecular surveillance of multidrug-resistant tuberculosis in Spain. *Infection, Genetics and Evolution*. **12** (4), 701-710.
- Geng, E.; Kreiswirth, B.; Driver, C. *et al.* 2002. Changes in the transmission of tuberculosis in New York City from 1990 to 1999. *New England Journal of Medicine*. **346** (19), 1453-1458.
- Gibbons, A. 2008. American Association of Physical Anthropologists Meeting: Tuberculosis jumped from humans to cows, not vice versa. *Science*. **320** (5876), 608.
- Gibson, A.L.; Hewinson, G.; Goodchild, T. *et al.* 2004. Molecular epidemiology of disease due to *Mycobacterium bovis* in humans in the United Kingdom. *Journal of Clinical Microbiology*. **42** (1), 431-434.
- Gil, M.; Moreno, R.; Marín, M. *et al.* 2011. Influence of immigration on tuberculosis transmission patterns in Castellón, Spain (2004-2007). *Gaceta Sanitaria*. **25** (2), 122-126.
- Gillespie, S.H.; Dickens, A. y McHugh, T.D. 2000. False molecular clusters due to nonrandom association of IS6110 with *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. **38** (6), 2081-2086.
- Glynn, J.R.; Bauer, J.; de Boer, A.S. *et al.* 1999a. Interpreting DNA fingerprint clusters of *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **3** (12), 1055-1060.
- Glynn, J.R.; Vynnycky, E. y Fine, P.E.M. 1999b. Influence of sampling on estimates of clustering and recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis* derived from DNA fingerprinting techniques. *American Journal of Epidemiology*. **149** (4), 366-371.
- Glynn, J.R.; Crampin, A.C.; Yates, M.D. *et al.* 2005. The importance of recent infection with *Mycobacterium tuberculosis* in an area with high HIV prevalence: a long-term molecular epidemiological study in Northern Malawi. *Journal of Infectious Diseases*. **192** (3), 480-487.
- Glynn, J.R.; Murray, J.; Bester, A. *et al.* 2010. High rates of recurrence in HIV-infected and HIV-uninfected patients with tuberculosis. *Journal of Infectious Diseases*. **201** (5), 704-711.
- Goguet de la Salmonière, Y.O.L.; Li, H.M.; Torrea, G. *et al.* 1997. Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. **35** (9), 2210-2214.
- Goguet de la Salmonière, Y.O.L.; Kim, C.C.; Tsolaki, A.G. *et al.* 2004. High-throughput method for detecting genomic-deletion polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology*. **42** (7), 2913-2918.
- Golden, M.P. y Vikram, H.R. 2005. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *American Family Physician*. **72** (9), 1761-1768.

- Gómez i Prat, J. y Mendonça de Souza, S.M.F. 2003. Prehistoric tuberculosis in America: adding comments to a literature review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. **98** (suppl. 1), 151-159.
- Gomez, J.E. y McKinney, J.D. 2004. *M. tuberculosis* persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis*. **84** (1-2), 29-44.
- González-Martín, J.; García-García, J.M.; Anibarro, L. *et al.* 2010. Consensus document on the diagnosis, treatment and prevention of tuberculosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. **46** (5), 255-274.
- Gonzalo-Asensio, J.; Malaga, W.; Pawlik, A. *et al.* 2014. Evolutionary history of tuberculosis shaped by conserved mutations in the PhoPR virulence regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **111** (31), 11491-11496.
- Gordon, S.V.; Bottai, D.; Simeone, R. *et al.* 2009. Pathogenicity in the tubercle bacillus: molecular and evolutionary determinants. *BioEssays*. **31** (4), 378-388.
- Gori, A.; Esposti, A.D.; Bandera, A. *et al.* 2005. Comparison between spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphisms in molecular genotyping analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Molecular and Cellular Probes*. **19** (4), 236-244.
- Gortázar, C.; Vicente, J.; Samper, S. *et al.* 2005. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in south-central Spain. *Veterinary Research*. **36** (1), 43-52.
- Goyal, M.; Young, D.; Zhang, Y. *et al.* 1994. PCR amplification of variable sequence upstream of *katG* gene to subdivide strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Clinical Microbiology*. **32** (12), 3070-3071.
- Gradmann, C. 2001. Robert Koch and the pressures of scientific research: tuberculosis and tuberculin. *Medical History*. **45** (1), 1-32.
- Grange, J.M.; Gibson, J. y Osborn, T.W. 1983. What is BCG? *Tubercle*. **64** (2), 129-139.
- Groenen, P.M.A.; Bunschoten, A.E.; van Soolingen, D. *et al.* 1993. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Molecular Microbiology*. **10** (5), 1057-1065.
- Grosset, J. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* in the extracellular compartment: an underestimated adversary. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **47** (3), 833-836.
- Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre el Diagnóstico, el Tratamiento y la Prevención de la Tuberculosis. Centro Cochrane Iberoamericano, coordinación. 2009. 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.
- Grupo de Trabajo de Tuberculosis de las Sociedades Científicas; Cominidades Autónomas y Ministerio de Sanidad y Consumo 2008. Plan para la prevención y control de la tuberculosis en España.
- Grzybowski, S. y Allen, E.A. 1995. History and importance of scrofula. *Lancet*. **346** (8988), 1472-1474.
- Guerra-Assunção, J.A.; Crampin, A.C.; Houben, R.M.G.J. *et al.* 2015. Large-scale whole genome sequencing of *M. tuberculosis* provides insights into transmission in a high prevalence area. *eLife*. **2015** (4), e05166.

- Guerrero, A.; Cobo, J.; Fortún, J. *et al.* 1997. Nosocomial transmission of *Mycobacterium bovis* resistant to 11 drugs in people with advanced HIV-1 infection. *Lancet*. **350** (9093), 1738-1742.
- Guio, H.; Vilaplana, C. y Cardona, P.J. 2011. Immunodiagnosis and biomarkers in tuberculosis. *Medicina clinica*. **137** (9), 408-413.
- Gutacker, M.M.; Smoot, J.C.; Migliaccio, C.A.L. *et al.* 2002. Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. *Genetics*. **162** (4), 1533-1543.
- Gutacker, M.M.; Mathema, B.; Soini, H. *et al.* 2006. Single-nucleotide polymorphism-based population genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from 4 geographic sites. *Journal of Infectious Diseases*. **193** (1), 121-128.
- Gutiérrez, M.C.; Brisse, S.; Brosch, R. *et al.* 2005. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens*. **1** (1), e5.
- Gutiérrez, M.C.; Vincent, V.; Aubert, D. *et al.* 1998. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. *Journal of Clinical Microbiology*. **36** (2), 486-492.
- Haas, W.H.; Butler, W.R.; Woodley, C.L. *et al.* 1993. Mixed-linker polymerase chain reaction: a new method for rapid fingerprinting of isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Clinical Microbiology*. **31** (5), 1293-1298.
- Haddad, N.; Masselot, M. y Durand, B. 2004. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. *Research in Veterinary Science*. **76** (1), 1-18.
- Hanekom, M.; van der Spuy, G.D.; Gey van Pittius, N.C. *et al.* 2008. Discordance between mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable- number tandem-repeat typing and IS6110 restriction fragment length polymorphism genotyping for analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains in a setting of high incidence of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. **46** (10), 3338-3345.
- Hansen, G.A. 1880. Bacillus leprae. *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin*. **79** (1), 32-42.
- Hartmans, S.; de Bont, J.A.M. y Stackebrandt, E. 2007. The Genus *Mycobacterium*-Nonmedical. En: Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K. H. y Stackebrandt, E. (eds.): *The Prokaryotes*. 3 ed. Springer-Verlag, New York. 889-918.
- Hawkey, P.M.; Smith, E.G.; Evans, J.T. *et al.* 2003. Mycobacterial interspersed repetitive unit typing of *Mycobacterium tuberculosis* compared to IS6110-based restriction fragment length polymorphism analysis for investigation of apparently clustered cases of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. **41** (8), 3514-3520.
- Heldal, E.; Dahle, U.R.; Sandven, P. *et al.* 2003. Risk factors for recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *European Respiratory Journal*. **22** (4), 637-642.
- Henao-Tamayo, M.; Obregón-Henao, A.; Ordway, D.J. *et al.* 2012. A mouse model of tuberculosis reinfection. *Tuberculosis*. **92** (3), 211-217.
- Hermans, P.W.M.; van Soolingen, D.; Dale, J.W. *et al.* 1990. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. **28** (9), 2051-2058.

- Hermans, P.W.M.; van Soolingen, D.; Bik, E.M. *et al.* 1991. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infection and Immunity*. **59** (8), 2695-2705.
- Hermans, P.W.M.; van Soolingen, D. y van Embden, J.D.A. 1992. Characterization of a major polymorphic tandem repeat in *Mycobacterium tuberculosis* and its potential use in the epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium goodii*. *Journal of Bacteriology*. **174** (12), 4157-4165.
- Hermoso de Mendoza, J.; Parra, A.; Tato, A. *et al.* 2006. Bovine tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*), red deer (*Cervus elaphus*) and cattle (*Bos taurus*) in a Mediterranean ecosystem (1992-2004). *Preventive Veterinary Medicine*. **74** (2-3), 239-247.
- Herrera, A.; Rodríguez, J.; Vicente, J. *et al.* 1998. Espondilodiscitis tuberculosa. Mal de Pott. *Revista de Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología*. **42** 231-242.
- Hershberg, R.; Lipatov, M.; Small, P.M. *et al.* 2008. High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. *PLoS Biology*. **6** (12), e311.
- Hershkovitz, I.; Donoghue, H.D.; Minnikin, D.E. *et al.* 2008. Detection and molecular characterization of 9000-year-old *Mycobacterium tuberculosis* from a neolithic settlement in the Eastern mediterranean. *PLOS ONE*. **3** (10), e3426.
- Hervás Castillo, A.; García Figueruelo, A.; Crespo, M. *et al.* 2007. Cervical lymphadenitis due to *Mycobacterium bovis*. *Acta Pediátrica Española*. **65** (5), 246-248.
- Herzog, H. 1998. History of tuberculosis. *Respiration*. **65** (1), 5-15.
- Hesseling, A.C.; Marais, B.J.; Kirchner, H.L. *et al.* 2010. Mycobacterial genotype is associated with disease phenotype in children. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **14** (10), 1252-1258.
- Hett, E.C. y Rubin, E.J. 2008. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **72** (1), 126-156.
- Hill, V.; Zozio, T.; Sadikalay, S. *et al.* 2012. MLVA based classification of *Mycobacterium tuberculosis* complex lineages for a robust phylogeographic snapshot of its worldwide molecular diversity. *PLoS ONE*. **7** (9), e41991.
- Hirsh, A.E.; Tsolaki, A.G.; DeRiemer, K. *et al.* 2004. Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101** (14), 4871-4876.
- Hlavsa, M.C.; Moonan, P.K.; Cowan, L.S. *et al.* 2008. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995-2005. *Clinical Infectious Diseases*. **47** (2), 168-175.
- Hofmann-Thiel, S.; van Ingen, J.; Feldmann, K. *et al.* 2009. Mechanisms of heteroresistance to isoniazid and rifampin of *Mycobacterium tuberculosis* in Tashkent, Uzbekistan. *European Respiratory Journal*. **33** (2), 368-374.
- Holloway, K.L.; Henneberg, R.J.; de Barros Lopes, M. *et al.* 2011. Evolution of human tuberculosis: a systematic review and meta-analysis of paleopathological evidence. *HOMO-Journal of Comparative Human Biology*. **62** (6), 402-458.
- Homolka, S.; Projahn, M.; Feuerriegel, S. *et al.* 2012. High resolution discrimination of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex strains based on single nucleotide polymorphisms. *PLoS ONE*. **7** (7), e39855.

- Honisch, C.; Mosko, M.; Arnold, C. *et al.* 2010. Replacing reverse line blot hybridization spoligotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Clinical Microbiology*. **48** (5), 1520-1526.
- Horwitz, O. 1973. Disease, cure, and death: epidemiologic and clinical parameters for chronic diseases illustrated by a model, tuberculosis. *American Journal of Epidemiology*. **97** (3), 148-159.
- Houben, R.M.G.J. y Glynn, J.R. 2009. A systematic review and meta-analysis of molecular epidemiological studies of tuberculosis: development of a new tool to aid interpretation. *Tropical Medicine and International Health*. **14** (8), 892-909.
- Houben, R.M.G.J.; Glynn, J.R.; Mboma, S. *et al.* 2012. The impact of HIV and ART on recurrent tuberculosis in a sub-Saharan setting. *AIDS*. **26** (17), 2233-2239.
- Huard, R.C.; Fabre, M.; de Haas, P. *et al.* 2006. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Bacteriology*. **188** (12), 4271-4287.
- Hughes, V.M.; Stevenson, K. y Sharp, J.M. 2001. Improved preparation of high molecular weight DNA for pulsed-field gel electrophoresis from mycobacteria. *Journal of Microbiological Methods*. **44** (3), 209-215.
- Hunter, P.R. y Gaston, M.A. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*. **26** (11), 2465-2466.
- Imaeda, T. 1985. Deoxyribonucleic acid relatedness among selected strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium microti*, and *Mycobacterium africanum*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **35** (2), 147-150.
- Incandela, M.L.; Perrin, E.; Fondi, M. *et al.* 2013. DprE1, a new taxonomic marker in mycobacteria. *FEMS microbiology letters*. **348** (1), 66-73.
- Iñigo Martínez, J.; Sánchez, F.C.; Arnáez, A.A. *et al.* 2000. Recent transmission of tuberculosis in Madrid (Spain): usefulness of molecular techniques. *Medicina Clínica*. **115** (7), 241-245.
- Iñigo Martínez, J.; Arce Arnáez, A.; Chaves Sánchez, F. *et al.* 2003. Patterns of tuberculosis transmission in a Health Area in Madrid, Spain. *Revista Española de Salud Pública*. **77** (5), 541-551.
- Iñigo, J.; García de Viedma, D.; Arce, A. *et al.* 2007. Analysis of changes in recent tuberculosis transmission patterns after a sharp increase in immigration. *Journal of Clinical Microbiology*. **45** (1), 63-69.
- Instituto de Estadística de Extremadura 2012. Padrón. Principales resultados 2012. <http://estadistica.gobex.es/gestore/docs/varios/padron/padron2012.pdf>.
- Ioerger, T.R.; Feng, Y.; Ganesula, K. *et al.* 2010. Variation among genome sequences of H37Rv strains of *Mycobacterium tuberculosis* from multiple laboratories. *Journal of Bacteriology*. **192** (14), 3645-3653.
- Iwamoto, T.; Grandjean, L.; Arikawa, K. *et al.* 2012. Genetic diversity and transmission characteristics of Beijing Family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru. *PLoS ONE*. **7** (11), e49651.
- Iwamoto, T.; Yoshida, S.; Suzuki, K. *et al.* 2007. Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on *Mycobacterium tuberculosis* strains predominated by the Beijing family. *FEMS Microbiology Letters*. **270** (1), 67-74.
- Jagielski, T.; van Ingen, J.; Rastogi, N. *et al.* 2014. Current methods in the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. *BioMed Research International*. **2014** (Art. No.: 645802), 1-21.

- Jansen, R.; van Embden, J.D.A.; Gaastra, W. *et al.* 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*. **43** (6), 1565-1575.
- Jasmer, R.M.; Roemer, M.; Hamilton, J. *et al.* 2002. A prospective, multicenter study of laboratory cross-contamination of *Mycobacterium tuberculosis* cultures. *Emerging Infectious Diseases*. **8** (11), 1260-1263.
- Jasmer, R.M.; Bozeman, L.; Schwartzman, K. *et al.* 2004. Recurrent tuberculosis in the United States and Canada: relapse or reinfection? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **170** (12), 1360-1366.
- Javed, M.T.; Aranaz, A.; de Juan, L. *et al.* 2007. Improvement of spoligotyping with additional spacer sequences for characterization of *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* isolates from Spain. *Tuberculosis*. **87** (5), 437-445.
- Jenkins, A.O.; Venter, E.H.; Hutamo, K. *et al.* 2010. Comparison of the capillary and agarose electrophoresis based multiple locus VNTR (variable number of tandem repeats) analysis (MLVA) on *Mycobacterium bovis* isolates. *Veterinary Microbiology*. **145** (1-2), 172-176.
- Jenkins, A.O.; Cadmus, S.I.B.; Venter, E.H. *et al.* 2011. Molecular epidemiology of human and animal tuberculosis in Ibadan, Southwestern Nigeria. *Veterinary Microbiology*. **151** (1-2), 139-147.
- Johnson, M.G.; Lindsey, P.H.; Harvey, C.F. *et al.* 2013. Recognizing laboratory cross-contamination: two false-positive cultures of *Mycobacterium tuberculosis* - Oklahoma, 2011. *Chest*. **144** (1), 319-322.
- Jonsson, J.; Hoffner, S.; Berggren, I. *et al.* 2014. Comparison between RFLP and MIRU-VNTR genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Stockholm 2009 to 2011. *PLoS ONE*. **9** (4), e95159.
- Kamerbeek, J.; Schouls, L.; Kolk, A. *et al.* 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*. **35** (4), 907-914.
- Kaplan, G.; Post, F.A.; Moreira, A.L. *et al.* 2003. *Mycobacterium tuberculosis* growth at the cavity surface: a microenvironment with failed immunity. *Infection and Immunity*. **71** (12), 7099-7108.
- Kappelman, J.; Alçiçek, M.C.; Kazanci, N. *et al.* 2008. First *Homo erectus* from Turkey and implications for migrations into temperate Eurasia. *American Journal of Physical Anthropology*. **135** (1), 110-116.
- Karakousis, P.C.; Bishal, W.R. y Dorman, S.E. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. *Cellular Microbiology*. **6** (2), 105-116.
- Karlson, A.G. y Lessel, E.F. 1970. *Mycobacterium bovis* nom. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **20** (3), 273-282.
- Kato-Maeda, M.; Rhee, J.T.; Gingeras, T.R. *et al.* 2001. Comparing genomes within the species *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Research*. **11** (4), 547-554.
- Kato-Maeda, M.; Gagneux, S.; Flores, L.L. *et al.* 2011. Strain classification of *Mycobacterium tuberculosis*: congruence between large sequence polymorphisms and spoligotypes. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **15** (1), 131-133.
- Kato-Maeda, M.; Ho, C.; Passarelli, B. *et al.* 2013. Use of whole genome sequencing to determine the microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* during an outbreak. *PLoS ONE*. **8** (3), e58235.
- Kaufmann, S.H.E. 2003. A short history of Robert Koch's fight against tuberculosis: those who do not remember the past are condemned to repeat it. *Tuberculosis*. **83** (1-3), 86-90.

- Kaufmann, S.H.E. y Schaible, U.E. 2005. 100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus. *Trends in Microbiology*. **13** (10), 469-475.
- Keane, J.; Gershon, S.; Wise, R.P. *et al.* 2001. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor α -neutralizing agent. *New England Journal of Medicine*. **345** (15), 1098-1104.
- Kerr, B.; Neuhauser, C.; Bohannon, B.J.M. *et al.* 2006. Local migration promotes competitive restraint in a host-pathogen 'tragedy of the commons'. *Nature*. **442** (7098), 75-78.
- Khosravi, A.D.; Vatani, S.; Feizabadi, M.M. *et al.* 2014. Application of pulsed field gel electrophoresis for study of genetic diversity in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from tuberculosis patients. *Jundishapur Journal of Microbiology*. **7** (5).
- Kim, S.H.; Song, K.H.; Choi, S.J.; Kim, H.-.; Kim, N.J.; Oh, M. *et al.* 2009. Diagnostic usefulness of a T-cell-based assay for extrapulmonary tuberculosis in immunocompromised patients. *American Journal of Medicine*. **122** (2), 189-195.
- Klaus, H.D.; Wilbur, A.K.; Temple, D.H. *et al.* 2010. Tuberculosis on the north coast of Peru: skeletal and molecular paleopathology of late pre-Hispanic and postcontact mycobacterial disease. *Journal of Archaeological Science*. **37** (10), 2587-2597.
- Klov Dahl, A.S.; Graviss, E.A.; Yaganehdooost, A. *et al.* 2001. Networks and tuberculosis: an undetected community outbreak involving public places. *Social Science and Medicine*. **52** (5), 681-694.
- Koch, R. 1882. Die Ätiologie der Tuberkulose. *Berliner Klinischen Wochenschrift*. **15**, 221-230.
- Kong, Y.; Cave, M.D.; Zhang, L. *et al.* 2007. Association between *Mycobacterium tuberculosis* Beijing/W lineage strain infection and extrathoracic tuberculosis: insights from epidemiologic and clinical characterization of the three principal genetic groups of *M. tuberculosis* clinical isolates. *Journal of clinical microbiology*. **45** (2), 409-414.
- Konomi, N.; Leibold, E.; Mowbray, K. *et al.* 2002. Detection of mycobacterial DNA in andean mummies. *Journal of Clinical Microbiology*. **40** (12), 4738-4740.
- Kremer, K.; van Soolingen, D.; Frothingham, R. *et al.* 1999. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *Journal of Clinical Microbiology*. **37** (8), 2607-2618.
- Kremer, K.; Arnold, C.; Cataldi, A. *et al.* 2005a. Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Journal of Clinical Microbiology*. **43** (11), 5628-5638.
- Kremer, K.; Au, B.K.Y.; Yip, P.C.W. *et al.* 2005b. Use of variable-number tandem-repeat typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology*. **43** (1), 314-320.
- Kubica, T.; Rüsç-Gerdes, S. y Niemann, S. 2003. *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. *Journal of Clinical Microbiology*. **41** (7), 3070-3077.
- Kwan, C. y Ernst, J.D. 2011. HIV and tuberculosis: a deadly human syndemic. *Clinical microbiology reviews*. **24** (2), 351-376.
- Lahey, T.; MacKenzie, T.; Arbeit, R.D. *et al.* 2013. Recurrent tuberculosis risk among HIV-infected adults in Tanzania with prior active tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*. **56** (1), 151-158.

- Lahlou, O.; Millet, J.; Chaoui, I. *et al.* 2012. The genotypic population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex from moroccan patients reveals a predominance of Euro-American lineages. *PLoS ONE*. **7** (10), e47113.
- Lamm, D.L. 1995. BCG immunotherapy for transitional-cell carcinoma in situ of the bladder. *Oncology*. **9** (10), 947-952+955.
- Lari, N.; Rindi, L.; Bonanni, D. *et al.* 2006. Molecular analysis of clinical isolates of *Mycobacterium bovis* recovered from humans in Italy. *Journal of Clinical Microbiology*. **44** (11), 4218-4221.
- Lari, N.; Rindi, L.; Cristofani, R. *et al.* 2009. Association of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates of BOVIS and Central Asian (CAS) genotypic lineages with extrapulmonary disease. *Clinical Microbiology and Infection*. **15** (6), 538-543.
- Lari, N.; Bimbi, N.; Rindi, L. *et al.* 2011. Genetic diversity of human isolates of *Mycobacterium bovis* assessed by spoligotyping and Variable Number Tandem Repeat genotyping. *Infection, Genetics and Evolution*. **11** (1), 175-180.
- Larson, J.L.; Lambert, L.; Stricof, R.L. *et al.* 2003. Potential nosocomial exposure to *Mycobacterium tuberculosis* from a bronchoscope. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. **24** (11), 825-830.
- Lawn, S.D.; Wood, R. y Wilkinson, R.J. 2011. Changing concepts of "latent tuberculosis infection" in patients living with HIV infection. *Clinical and Developmental Immunology*. **2011** (980594),
- Lawn, S.D. y Zumla, A.I. 2011. Tuberculosis. *The Lancet*. **378** (9785), 57-72.
- Le Flèche, P.; Fabre, M.; Denoeud, F. *et al.* 2002. High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing. *BMC Microbiology*. **2** (1), 37.
- Lee, A.S.G.; Tang, L.L.H.; Lim, I.H.K. *et al.* 2002. Discrimination of single-copy IS6110 DNA fingerprints of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by high-resolution minisatellite-based typing. *Journal of Clinical Microbiology*. **40** (2), 657-659.
- Lee, O.Y.C.; Wu, H.H.T.; Donoghue, H.D. *et al.* 2012. *Mycobacterium tuberculosis* complex lipid virulence factors preserved in the 17000-year-old skeleton of an extinct bison, bison antiquus. *PLoS ONE*. **7** (7), e41923.
- Legrand, E.; Filliol, I.; Sola, C. *et al.* 2001. Use of spoligotyping to study the evolution of the direct repeat locus by IS6110 transposition in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. **39** (4), 1595-1599.
- Lehmann, K.B. y Neumann, R. 1896. Atlas und grundriss der bakterilogie und lehrbuch der speziellen bakterilogischen diagnostik. 1ª ed. J. F. Lehmann Verlag, Munich.
- Lemassu, A.; Ortalo-Magné, A.; Bardou, F. *et al.* 1996. Extracellular and surface-exposed polysaccharides of non-tuberculous mycobacteria. *Microbiology*. **142** (6), 1513-1520.
- Levy-Frebault, V.V. y Portaels, F. 1992. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **42** (2), 315-323.
- Li, Q.; Whalen, C.C.; Albert, J.M. *et al.* 2002. Differences in rate and variability of intracellular growth of a panel of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates within a human monocyte model. *Infection and immunity*. **70** (11), 6489-6493.
- Lienhardt, C.; Glaziou, P.; Uplekar, M. *et al.* 2012. Global tuberculosis control: lessons learnt and future prospects. *Nature Reviews Microbiology*. **10** (6), 407-416.

- Lillebaek, T.; Dirksen, A.; Baess, I. *et al.* 2002. Molecular evidence of endogenous reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* after 33 years of latent infection. *Journal of Infectious Diseases*. **185** (3), 401-404.
- Lin, P.G. y Flynn, J.L. 2010. Understanding latent tuberculosis: a moving target. *Journal of Immunology*. **185** (1), 15-22.
- Lindstedt, B.A. 2005. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis*. **26** (13), 2567-2582.
- Liu, X.; Gutacker, M.M.; Musser, J.M. *et al.* 2006. Evidence for recombination in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*. **188** (23), 8169-8177.
- LoBue, P.A.; Betancourt, W.; Peter, C. *et al.* 2003. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in San Diego County, 1994-2000. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **7** (2), 180-185.
- LoBue, P.A.; Betancourt, W.; Cowan, L. *et al.* 2004. Identification of a familial cluster of pulmonary *Mycobacterium bovis* disease. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **8** (9), 1142-1146.
- Lombardi, G.P. y Cáceres, U.G. 2000. Multisystemic tuberculosis in a pre-Columbian Peruvian mummy: four diagnostic levels, and a paleoepidemiological hypothesis. *Chungará, Revista de Antropología Chilena*. **32** (1), 55-60.
- Lomme, J.R.; Thoen, C.O.; Himes, E.M. *et al.* 1976. *Mycobacterium tuberculosis* infection in two East African oryxes. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **169** (9), 912-914.
- López-Calleja, A.I.; Lezcano, M.A.; Vitoria, M.A. *et al.* 2007. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* over two periods: a changing scenario for tuberculosis transmission. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **11** (10), 1080-1086.
- López-Calleja, A.I.; Gavín, P.; Lezcano, M.A. *et al.* 2009. Unsuspected and extensive transmission of a drug-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strain. *BMC Pulmonary Medicine*. **9** (3).
- Love, J.; Sonnenberg, P.; Glynn, J.R. *et al.* 2009. Molecular epidemiology of tuberculosis in England, 1998. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **13** (2), 201-207.
- Lucerna, M.A.; Rodríguez-Contreras, R.; Barroso, P. *et al.* 2011. Molecular epidemiology of tuberculosis in Almería (Spain). Factors associated with recent transmission. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. **29** (3), 174-178.
- Luo, T.; Yang, C.; Peng, Y. *et al.* 2014. Whole-genome sequencing to detect recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in settings with a high burden of tuberculosis. *Tuberculosis*. **94** (4), 434-440.
- Mack, U.; Migliori, G.B.; Sester, M. *et al.* 2009. LTBI: Latent tuberculosis infection or lasting immune responses to *M. tuberculosis*? A TBNET consensus statement. *European Respiratory Journal*. **33** (5), 956-973.
- Mackowiak, P.A.; Blos, V.T.; Aguilar, M. *et al.* 2005. On the origin of American tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*. **41** (4), 515-518.
- Magdalena, J.; Vachée, A.; Supply, P. *et al.* 1998. Identification of a new DNA region specific for members of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Clinical Microbiology*. **36** (4), 937-943.
- Majoor, C.J.; Magis-Escurra, C.; van Ingen, J. *et al.* 2011. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in humans, The Netherlands, 1993-2007. *Emerging Infectious Diseases*. **17** (3), 457-463.

- Malama, S.; Johansen, T.B.; Muma, J.B. *et al.* 2014. Characterization of *Mycobacterium bovis* from humans and cattle in Namwala District, Zambia. *Veterinary Medicine International*. **2014**
- Mandal, S.; Bradshaw, L.; Anderson, L.F. *et al.* 2011. Investigating transmission of *Mycobacterium bovis* in the United Kingdom in 2005 to 2008. *Journal of Clinical Microbiology*. **49** (5), 1943-1950.
- Maradona, J.A. 2009. Tuberculosis, historia de su conocimiento. 1ª ed. Ediciones de la Universidad de Oviedo, Oviedo.
- Marketos, S.G. y Skiadas, P.K. 1999. Galen: A pioneer of spine research. *Spine*. **24** (22), 2358-2362.
- Martín, A.; Herranz, M.; Serrano, M.J.R. *et al.* 2007. Rapid clonal analysis of recurrent tuberculosis by direct MIRU-VNTR typing on stored isolates. *BMC Microbiology*. **7** (73).
- Martín, A.; Herranz, M.; Martínez-Lirola, M. *et al.* 2008. Optimized molecular resolution of cross-contamination alerts in clinical mycobacteriology laboratories. *BMC Microbiology*. **8** (30).
- Martín, A.; Herranz, M.; Navarro, Y. *et al.* 2011. Evaluation of the inaccurate assignment of mixed infections by *Mycobacterium tuberculosis* as exogenous reinfection and analysis of the potential role of bacterial factors in reinfection. *Journal of Clinical Microbiology*. **49** (4), 1331-1338.
- Martín, A.; Herranz, M.; Ruiz Serrano, M.J. *et al.* 2010. The clonal composition of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens could be modified by culture. *Tuberculosis*. **90** (3), 201-207.
- Martínez, M.; García de Viedma, D.; Alonso, M. *et al.* 2006. Impact of laboratory cross-contamination on molecular epidemiology studies of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. **44** (8), 2967-2969.
- Martínez-Guarneros, A.; Rastogi, N.; Couvin, D. *et al.* 2013. Genetic diversity among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Mexico. *Infection, Genetics and Evolution*. **14** (1), 434-443.
- Martínez-Lirola, M.; Alonso-Rodríguez, N.; Sánchez, M.L. *et al.* 2008. Advanced survey of tuberculosis transmission in a complex socioepidemiologic scenario with a high proportion of cases in immigrants. *Clinical Infectious Diseases*. **47** (1), 8-14.
- Marzo, E.; Vilaplana, C.; Tapia, G. *et al.* 2014. Damaging role of neutrophilic infiltration in a mouse model of progressive tuberculosis. *Tuberculosis*. **94** (1), 55-64.
- Masson, M.; Molnár, E.; Donoghue, H.D. *et al.* 2013. Osteological and biomolecular evidence of a 7000-year-old case of hypertrophic pulmonary osteopathy secondary to tuberculosis from Neolithic Hungary. *PLoS ONE*. **8** (10), e78252.
- Mathema, B.; Kurepina, N.E.; Bifani, P.J. *et al.* 2006. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clinical Microbiology Reviews*. **19** (4), 658-685.
- Mathema, B.; Kurepina, N.; Fallows, D. *et al.* 2008. Lessons from molecular epidemiology and comparative genomics. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. **29** (5), 467-480.
- Mathuria, J.P.; Sharma, P.; Prakash, P. *et al.* 2008. Role of spoligotyping and IS6110-RFLP in assessing genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in India. *Infection, Genetics and Evolution*. **8** (3), 346-351.
- Mays, S. y Taylor, G.M. 2003. A first prehistoric case of tuberculosis from Britain. *International Journal of Osteoarchaeology*. **13** (4), 189-196.
- Mazars, E.; Lesjean, S.; Banuls, A.L. *et al.* 2001. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **98** (4), 1901-1906.

- McAdam, R.A.; Hermans, P.W.M.; van Soolingen, D. *et al.* 1990. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. *Molecular Microbiology*. **4** (9), 1607-1613.
- McLernon, J.; Costello, E.; Flynn, O. *et al.* 2010. Evaluation of mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat analysis and spoligotyping for genotyping of *Mycobacterium bovis* isolates and a comparison with restriction fragment length polymorphism typing. *Journal of Clinical Microbiology*. **48** (12), 4541-4545.
- McNabb, S.J.N.; Kammerer, J.S.; Hickey, A.C. *et al.* 2004. Added epidemiologic value to tuberculosis prevention and control of the investigation of clustered genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *American Journal of Epidemiology*. **160** (6), 589-597.
- Mears, J.; Abubakar, I.; Cohen, T. *et al.* 2015. Effect of study design and setting on tuberculosis clustering estimates using Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number Tandem Repeats (MIRU-VNTR): a systematic review. *BMJ Open*. **5** (1), e005636.
- Merker, M.; Kohl, T.A.; Roetzer, A. *et al.* 2013. Whole genome sequencing reveals complex evolution patterns of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains in patients. *PLoS ONE*. **8** (12), e82551.
- Metcalfe, J.Z.; Kim, E.Y.; Grace Lin, S.-. *et al.* 2010. Determinants of multidrug-resistant tuberculosis clusters, California, USA, 2004-2007. *Emerging Infectious Diseases*. **16** (9), 1403-1409.
- Michele, T.M.; Cronin, W.A.; Graham, N.M.H. *et al.* 1997. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* by a fiberoptic bronchoscope identification by dna fingerprinting. *Journal of the American Medical Association*. **278** (13), 1093-1095.
- Mignard, S.; Pichat, C. y Carret, G. 2006. *Mycobacterium bovis* infection, Lyon, France. *Emerging Infectious Diseases*. **12** (9), 1431-1433.
- Millet, J.P.; Shaw, E.; Orcau, À. *et al.* 2013. Tuberculosis recurrence after completion treatment in a european city: reinfection or relapse? *PLoS ONE*. **8** (6), e64898.
- Mojica, F.J.M.; Díez-Villaseñor, C.; García-Martínez, J. *et al.* 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*. **60** (2), 174-182.
- Mollenkopf, H.J.; Kursar, M. y Kaufmann, S.H.E. 2004. Immune response to postprimary tuberculosis in mice: *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin induce equal protection. *Journal of Infectious Diseases*. **190** (3), 588-597.
- Moonan, P.K.; Ghosh, S.; Oeltmann, J.E. *et al.* 2012. Using genotyping and geospatial scanning to estimate recent *Mycobacterium tuberculosis* transmission, United States. *Emerging Infectious Diseases*. **18** (3), 458-465.
- Moreira, A.L.; Tsenova, L.; Aman, M.H.; Bekker, L.-.; Freeman, S.; Mangaliso, B. *et al.* 2002. Mycobacterial antigens exacerbate disease manifestations in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infection and Immunity*. **70** (4), 2100-2107.
- Mostowy, S.; Cousins, D.; Brinkman, J. *et al.* 2002. Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Infectious Diseases*. **186** (1), 74-80.
- Mostowy, S. y Behr, M.A. 2005. The origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinics in Chest Medicine*. **26** (2), 207-216.
- Mukadi, Y.; Perriens, J.H.; St Louis, M.E. *et al.* 1993. Spectrum of immunodeficiency in HIV-1-infected patients with pulmonary tuberculosis in Zaire. *Lancet*. **342** (8864), 143-146.

- Mulenga, C.; Shamputa, I.C.; Mwakazanga, D. *et al.* 2009. Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes circulating in Ndola, Zambia. *BMC Infectious Diseases*. **10** (177).
- Müller, B.; Dürr, S.; Alonso, S. *et al.* 2013. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerging Infectious Diseases*. **19** (6), 899-908.
- Murase, Y.; Mitarai, S.; Sugawara, I. *et al.* 2008. Promising loci of variable numbers of tandem repeats for typing Beijing family *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Medical Microbiology*. **57** (7), 873-880.
- Murray, M. 2002. Sampling bias in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Emerging Infectious Diseases*. **8** (4), 363-369.
- Murray, M. y Alland, D. 2002. Methodological problems in the molecular epidemiology of tuberculosis. *American Journal of Epidemiology*. **155** (6), 565-571.
- Murray, J.F. 2004a. A century of tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **169** (11), 1181-1186.
- Murray, J.F. 2004b. *Mycobacterium tuberculosis* and the cause of consumption: from discovery to fact. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **169** (10), 1086-1088.
- Muwonge, A.; Kankya, C.; Olea-Popelka, F. *et al.* 2013. Molecular investigation of multiple strain infections in patients with tuberculosis in Mubende district, Uganda. *Infection, Genetics and Evolution*. **17** 16-22.
- Namouchi, A.; Didelot, X.; Schöck, U. *et al.* 2012. After the bottleneck: Genome-wide diversification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by mutation, recombination, and natural selection. *Genome Research*. **22** (4), 721-734.
- Naranjo, V.; Gortázar, C.; Vicente, J. *et al.* 2008. Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Veterinary Microbiology*. **127** (1-2), 1-9.
- Narayanan, S.; Swaminathan, S.; Supply, P. *et al.* 2010. Impact of HIV infection on the recurrence of tuberculosis in south India. *Journal of Infectious Diseases*. **201** (5), 691-703.
- National Research Council 2000. Ending Neglect: The Elimination of Tuberculosis in the United States. The National Academies Press, Washington, DC.
- Nava-Aguilera, E.; Andersson, N.; Harris, E. *et al.* 2009. Risk factors associated with recent transmission of tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **13** (1), 17-26.
- Navarro, Y.; Herranz, M.; Pérez-Lago, L. *et al.* 2011. Systematic survey of clonal complexity in tuberculosis at a populational level and detailed characterization of the isolates involved. *Journal of Clinical Microbiology*. **49** (12), 4131-4137.
- Navarro, Y.; Pérez-Lago, L.; Sisilema, F. *et al.* 2013. Unmasking subtle differences in the infectivity of microevolved *Mycobacterium tuberculosis* variants coinfecting the same patient. *International Journal of Medical Microbiology*. **303** (8), 693-696.
- Navarro, Y.; Herranz, M.; Romero, B. *et al.* 2014. High-throughput multiplex MIRU-VNTR typing of *Mycobacterium bovis*. *Research in Veterinary Science*. **96** (3), 422-425.
- Nerlich, A.G.; Haas, C.J.; Zink, A. *et al.* 1997. Molecular evidence for tuberculosis in an ancient Egyptian mummy. *Lancet*. **350** (9088), 1404.

- Nerlich, A.G. y Lösch, S. 2009. Paleopathology of human tuberculosis and the potential role of climate. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. **2009** (437187), 1-9.
- Newport, M.J. 2013. The contribution of host genetics to TB disease. *Current Respiratory Medicine Reviews*. **9** (3), 156-162.
- Nicklisch, N.; Maixner, F.; Ganslmeier, R. *et al.* 2012. Rib lesions in skeletons from early neolithic sites in Central Germany: on the trail of tuberculosis at the onset of agriculture. *American Journal of Physical Anthropology*. **149** (3), 391-404.
- Nicol, M.P.; Sola, C.; February, B. *et al.* 2005. Distribution of strain families of *Mycobacterium tuberculosis* causing pulmonary and extrapulmonary disease in hospitalized children in Cape Town, South Africa. *Journal of Clinical Microbiology*. **43** (11), 5779-5781.
- Niemann, S.; Richter, E. y Rüscher-Gerdes, S. 1999. Stability of *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns and spoligotypes determined by analyzing serial isolates from patients with drug-resistant tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. **37** (2), 409-412.
- Niemann, S.; Richter, E.; Rüscher-Gerdes, S. *et al.* 2000. Double infection with a resistant and a multidrug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Infectious Diseases*. **6** (5), 548-551.
- Niemann, S.; Köser, C.U.; Gagneux, S. *et al.* 2009. Genomic diversity among drug sensitive and multidrug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with identical DNA fingerprints. *PLoS ONE*. **4** (10), e7407.
- Ninet, B.; Monod, M.; Emler, S. *et al.* 1996. Two different 16S rRNA genes in a mycobacterial strain. *Journal of Clinical Microbiology*. **34** (10), 2531-2536.
- Nitta, A.T.; Davidson, P.T.; de Koning, M.L. *et al.* 1996. Misdiagnosis of multidrug-resistant tuberculosis possibly due to laboratory related errors. *Journal of the American Medical Association*. **276** (24), 1980-1983.
- North, R.J. y Jung, Y.J. 2004. Immunity to tuberculosis. *Annual Review of Immunology*. **22** 599-623.
- Northrup, J.M.; Miller, A.C.; Nardell, E. *et al.* 2002. Estimated costs of false laboratory diagnoses of tuberculosis in three patients. *Emerging Infectious Diseases*. **8** (11), 1264-1270.
- Oelemann, M.C.; Diel, R.; Vatin, V. *et al.* 2007. Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive-unit- variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. **45** (3), 691-697.
- O'Garra, A.; Redford, P.S.; McNab, F.W. *et al.* 2013. The immune response in tuberculosis. *Annual Review of Immunology*. **31** 475-527.
- Ojha, A.K.; Baughn, A.D.; Sambandan, D. *et al.* 2008. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Molecular microbiology*. **69** (1), 164-174.
- Ojo, O.; Sheehan, S.; Corcoran, G.D. *et al.* 2008. *Mycobacterium bovis* strains causing smear-positive human tuberculosis, southwest Ireland. *Emerging Infectious Diseases*. **14** (12), 1931-1934.
- Orcau, A.; Caylà, J.A. y Martínez, J.A. 2011. Present epidemiology of tuberculosis. Prevention and control programs. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. **29** (SUPPL. 1), 2-7.
- O'Reilly, L.M. y Daborn, C.J. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle and Lung Disease*. **76** (SUPPL. 1), 1-46.

- Orme, I.M. 2001. The latent tuberculosis bacillus (I'll let you know if I ever meet one). *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **5** (7), 589-593.
- Orme, I.M. 2011. Development of new vaccines and drugs for TB: limitations and potential strategic errors. *Future Microbiology*. **6** (2), 161-177.
- Orme, I.M. 2014. A new unifying theory of the pathogenesis of tuberculosis. *Tuberculosis*. **94** (1), 8-14.
- Ortalo-Magné, A.; Dupont, M.A.; Lemassu, A. *et al.* 1995. Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiology*. **141** (7), 1609-1620.
- Ortalo-Magné, A.; Lemassu, A.; Lanéelle, M.A. *et al.* 1996. Identification of the surface-exposed lipids on the cell envelopes of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacterial species. *Journal of Bacteriology*. **178** (2), 456-461.
- Ortner, D.J. y Putschar, W.G. 1981. Identification of pathological conditions in human skeletal remains. 1ª ed. Smithsonian Institution Press, Washington.
- Otal, I.; Samper, S.; Asensio, M.P. *et al.* 1997. Use of a PCR method based on IS6110 polymorphism for typing *Mycobacterium tuberculosis* strains from BACTEC cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. **35** (1), 273-277.
- Ozcaglar, C.; Shabbeer, A.; Kurepina, N. *et al.* 2012. Inferred spoligoforest topology unravels spatially bimodal distribution of mutations in the DR region. *IEEE Transactions on Nanobioscience*. **11** (3), 191-202.
- Pai, M.; Zwerling, A. y Menzies, D. 2008. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Annals of Internal Medicine*. **149** (3), 177-184.
- Palenque, E.; Villena, V.; Rebollo, M.J. *et al.* 1998. Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* to an immunocompetent patient. *Clinical Infectious Diseases*. **26** (4), 995-996.
- Palittapongarnpim, P.; Rienthong, S. y Panbangred, W. 1993. Comparison of restriction fragment length polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from cerebrospinal fluid and sputum: a preliminary report. *Tubercle and Lung Disease*. **74** (3), 204-207.
- Pan, Y.; Yang, X.; Duan, J. *et al.* 2011. Whole-genome sequences of four *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains. *Journal of Bacteriology*. **193** (12), 3152-3153.
- Pang, J.M.; Layre, E.; Sweet, L. *et al.* 2012. The polyketide *pkS1* contributes to biofilm formation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*. **194** (3), 715-721.
- Pareek, M.; Evans, J.; Innes, J. *et al.* 2013. Ethnicity and mycobacterial lineage as determinants of tuberculosis disease phenotype. *Thorax*. **68** (3), 221-229.
- Parra, A.; Larrasa, J.; García, A. *et al.* 2005. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in wild animals in Spain: a first approach to risk factor analysis. *Veterinary Microbiology*. **110** (3-4), 293-300.
- Parsons, L.M.; Brosch, R.; Cole, S.T. *et al.* 2002. Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. **40** (7), 2339-2345.
- Parsons, S.D.C.; Drewe, J.A.; van Pittius, N.C.G. *et al.* 2013. Novel cause of tuberculosis in meerkats, South Africa. *Emerging Infectious Diseases*. **19** (12), 2004-2007.

- Parwati, I.; van Crevel, R. y van Soolingen, D. 2010. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. *The Lancet Infectious Diseases*. **10** (2), 103-111.
- Pearson, T.; Okinaka, R.T.; Foster, J.T. *et al.* 2009. Phylogenetic understanding of clonal populations in an era of whole genome sequencing. *Infection, Genetics and Evolution*. **9** (5), 1010-1019.
- Pena, M.J.; Caminero, J.A.; Campos-Herrero, M.I. *et al.* 2003. Epidemiology of tuberculosis on Gran Canaria: a 4 year population study using traditional and molecular approaches. *Thorax*. **58** (7), 618-622.
- Perdigão, J.; MacEdo, R.; João, I. *et al.* 2008. Multidrug-resistant tuberculosis in Lisbon, Portugal: a molecular epidemiological perspective. *Microbial Drug Resistance*. **14** (2), 133-143.
- Perdigão, J.; Macedo, R.; Silva, C. *et al.* 2011. Tuberculosis drug-resistance in Lisbon, Portugal: a 6-year overview. *Clinical Microbiology and Infection*. **17** (9), 1397-1402.
- Pérez-Lago, L.; Herranz, M.; Martínez Lirola, M. *et al.* 2011. Characterization of microevolution events in *Mycobacterium tuberculosis* strains involved in recent transmission clusters. *Journal of Clinical Microbiology*. **49** (11), 3771-3776.
- Pérez-Lago, L.; Herranz, M.; Bouza, E. *et al.* 2012. Dynamic and complex *Mycobacterium tuberculosis* microevolution unrevealed by standard genotyping. *Tuberculosis*. **92** (3), 232-235.
- Pérez-Lago, L.; Comas, I.; Navarro, Y. *et al.* 2014a. Whole genome sequencing analysis of inpatient microevolution in *Mycobacterium tuberculosis*: potential impact on the inference of tuberculosis transmission. *Journal of Infectious Diseases*. **209** (1), 98-108.
- Pérez-Lago, L.; Navarro, Y. y García de Viedma, D. 2014b. Current knowledge and pending challenges in zoonosis caused by *Mycobacterium bovis*: a review. *Research in Veterinary Science*. **97**, S94-S100.
- Pérez-Lago, L.; Palacios, J.J.; Herranz, M. *et al.* 2015. Revealing hidden clonal complexity in *Mycobacterium tuberculosis* infection by qualitative and quantitative improvement of sampling. *Clinical Microbiology and Infection*. **21** (2), 147.e1-147.e7.
- Perri, B.R.; Proops, D.; Moonan, P.K. *et al.* 2011. *Mycobacterium tuberculosis* cluster with developing drug resistance, New York, New York, USA, 2003-2009. *Emerging Infectious Diseases*. **17** (3), 372-378.
- Peters, T.M. 2009. Pulsed-field gel electrophoresis for molecular epidemiology of food pathogens. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. **551**, 59-70.
- Peto, H.M.; Pratt, R.H.; Harrington, T.A. *et al.* 2009. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in the United States, 1993-2006. *Clinical Infectious Diseases*. **49** (9), 1350-1357.
- Pfyffer, G.E.; Auckenthaler, R.; Van Embden, J.D.A. *et al.* 1998. *Mycobacterium canettii*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. *Emerging Infectious Diseases*. **4** (4), 631-634.
- Philips, J.A. y Ernst, J.D. 2012. Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. **7** 353-384.
- Portevin, D.; Gagneux, S.; Comas, I. *et al.* 2011. Human macrophage responses to clinical isolates from the *Mycobacterium tuberculosis* complex discriminate between ancient and modern lineages. *PLoS Pathogens*. **7** (3), e1001307.
- Post, F.A.; Willcox, P.A.; Mathema, B. *et al.* 2004. Genetic polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with chronic multidrug-resistant tuberculosis. *Journal of Infectious Diseases*. **190** (1), 99-106.

- Poulet, S. y Cole, S.T. 1995. Characterization of the highly abundant polymorphic GC-rich-repetitive sequence (PGRS) present in *Mycobacterium tuberculosis*. *Archives of Microbiology*. **163** (2), 87-95.
- Pourcel, C.; Salvignol, G. y Vergnaud, G. 2005. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*. **151** (3), 653-663.
- Prod'Hom, G.; Guilhot, C.; Gutiérrez, M.C. *et al.* 1997. Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by ligation-mediated PCR fingerprint analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. **35** (12), 3331-3334.
- Rad, M.E.; Bifani, P.; Martin, C. *et al.* 2003. Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family. *Emerging Infectious Diseases*. **9** (7), 838-845.
- Ramaswamy, S. y Musser, J.M. 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tubercle and Lung Disease*. **79** (1), 3-29.
- Ramos, A.; Noblejas, A.; Martin, T. *et al.* 2004. Prolonged survival of an HIV-infected patient with multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* infection treated with surgical resection. *Clinical Infectious Diseases*. **39** (6), 53-55.
- Ramos, M.D.C.; Soini, H.; Roscanni, G.C. *et al.* 1999. Extensive cross-contamination of specimens with *Mycobacterium tuberculosis* in a reference laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. **37** (4), 916-919.
- Ramsey, A.H.; Oemig, T.V.; Davis, J.P. *et al.* 2002. An outbreak of bronchoscopy-related *Mycobacterium tuberculosis* infections due to lack of bronchoscope leak testing. *Chest*. **121** (3 SUPPL.), 976-981.
- Rasanathan, K.; Sivasankara Kurup, A.; Jaramillo, E. *et al.* 2011. The social determinants of health: key to global tuberculosis control. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **15** (SUPPL. 2), S30-S36.
- Rastogi, N.; Legrand, E. y Sola, C. 2001. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *OIE Revue Scientifique et Technique*. **20** (1), 21-54.
- Rastogi, N. y Couvin, D. 2014. Phylogenetic associations with demographic, epidemiological and drug resistance characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* lineages in the SITVIT2 database: Macro- and micro-geographical cleavages and phylogeographical specificities. *International Journal of Mycobacteriology*. **4** (1), 117-118.
- Raviglione, M.C. 2003. The TB epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis*. **83** (1-3), 4-14.
- Raviglione, M. y Krech, R. 2011. Tuberculosis: still a social disease. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **15** (SUPPL. 2), S6-S8.
- Raviglione, M.; Marais, B.; Floyd, K. *et al.* 2012. Scaling up interventions to achieve global tuberculosis control: progress and new developments. *The Lancet*. **379** (9829), 1902-1913.
- Realpe, T.; Correa, N.; Rozo, J.C. *et al.* 2014. Population structure among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from pulmonary tuberculosis patients in Colombia. *PLoS ONE*. **9** (4), e93848.
- Reed, G.B. 1957. Genus *Mycobacterium* (species affecting warm-blooded animals except those causing leprosy). En: Breed, R.S.; Murray, E. G. D. y Smith, N. R. (eds.): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 7ª ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. 703-704.
- Reed, M.B.; Pichler, V.K.; McIntosh, F. *et al.* 2009. Major *Mycobacterium tuberculosis* lineages associate with patient country of origin. *Journal of clinical microbiology*. **47** (4), 1119-1128.

- Reischl, U.; Feldmann, K.; Naumann, L. *et al.* 1998. 16S rRNA sequence diversity in *Mycobacterium celatum* strains caused by presence of two different copies of 16S rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*. **36** (6), 1761-1764.
- Reisig, F.; Kremer, K.; Amthor, B. *et al.* 2005. Fast ligation-mediated PCR, a fast and reliable method for IS6110-based typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Clinical Microbiology*. **43** (11), 5622-5627.
- Remacha, M.A.; Parra, M.I. y Esteban, A. 2006. Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in León. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **10** (3), 349-350.
- Repique, C.J.; Li, A.; Collins, F.M. *et al.* 2002. DNA immunization in a mouse model of latent tuberculosis: effect of DNA vaccination on reactivation of disease and on reinfection with a secondary challenge. *Infection and Immunity*. **70** (7), 3318-3323.
- Reyes, J.F.; Chan, C.H.S. y Tanaka, M.M. 2012. Impact of homoplasmy on variable numbers of tandem repeats and spoligotypes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection, Genetics and Evolution*. **12** (4), 811-818.
- Rhee, J.T.; Tanaka, M.M.; Behr, M.A. *et al.* 2000. Use of multiple markers in population-based molecular epidemiologic studies of tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **4** (12), 1111-1119.
- Riccardi, G.; Pasca, M.R.; Chiarelli, L.R. *et al.* 2013. The DprE1 enzyme, one of the most vulnerable targets of *Mycobacterium tuberculosis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **97** (20), 8841-8848.
- Rinder, H.; Mieskes, K.T. y Löscher, T. 2001. Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **5** (4), 339-345.
- Rindi, L.; Lari, N. y Garzelli, C. 2012. Large Sequence Polymorphisms of the Euro-American lineage of *Mycobacterium tuberculosis*: A phylogenetic reconstruction and evidence for convergent evolution in the DR locus. *Infection, Genetics and Evolution*. **12** (7), 1551-1557.
- Rindi, L.; Medici, C.; Bimbi, N. *et al.* 2014. Genomic variability of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Euro-american lineage based on large sequence deletions and 15-locus MIRU-VNTR polymorphism. *PLoS ONE*. **9** (9), e107150.
- Ríos, M. y Monleón-Getino, T. 2009. A graphical study of tuberculosis incidence and trends in the WHO's European region (1980-2006). *European Journal of Epidemiology*. **24** (7), 381-387.
- Rivero, A.; Márquez, M.; Santos, J. *et al.* 2001. High rate of tuberculosis reinfection during a nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* strain B. *Clinical Infectious Diseases*. **32** (1), 159-161.
- Roberts, C.A. y Buikstra, J.E. 2003. The bioarchaeology of tuberculosis: a global perspective on a reemerging disease. 1ª ed. University Press of Florida, Gainesville.
- Roberts, C.A.; Pfister, L.A. y Mays, S. 2009. Was tuberculosis present in *Homo erectus* in Turkey? *American Journal of Physical Anthropology*. **139** (3), 442-444.
- Roberts, I.S. 1996. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annual Review of Microbiology*. **50** 285-315.
- Robertson, B.D.; Altmann, D.; Barry, C. *et al.* 2012. Detection and treatment of subclinical tuberculosis. *Tuberculosis*. **92** (6), 447-452.

- Robles, P.; Esteban, J. y Fernández, M.L. 2002. Pulmonary tuberculosis due to multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* in a healthy host. *Clinical Infectious Diseases*. **35** (2), 212-213.
- Rodrigo, T.; Caylà, J.A.; García de Olalla, P. *et al.* 1997. Characteristics of tuberculosis patients who generate secondary cases. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **1** (4), 352-357.
- Rodríguez, E.; Sánchez, L.P.; Pérez, S. *et al.* 2009. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Spain, 2004-2007. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **13** (12), 1536-1541.
- Rodríguez, S.; Romero, B.; Bezos, J. *et al.* 2010. High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: clues to understanding the demography of the pathogen in Europe. *Veterinary Microbiology*. **141** (1-2), 89-95.
- Rodríguez-Campos, S.; Aranaz, A.; de Juan, L. *et al.* 2011. Limitations of spoligotyping and variable-number tandem-repeat typing for molecular tracing of *Mycobacterium bovis* in a high-diversity setting. *Journal of Clinical Microbiology*. **49** (9), 3361-3364.
- Rodríguez-Campos, S.; González, S.; de Juan, L. *et al.* 2012. A database for animal tuberculosis (mycoDB.es) within the context of the Spanish national programme for eradication of bovine tuberculosis. *Infection, Genetics and Evolution*. **12** (4), 877-882.
- Rodríguez-Campos, S.; Navarro, Y.; Romero, B. *et al.* 2013. Splitting of a prevalent *Mycobacterium bovis* spoligotype by variable-number tandem-repeat typing reveals high heterogeneity in an evolving clonal group. *Journal of Clinical Microbiology*. **51** (11), 3658-3665.
- Rodwell, T.C.; Moore, M.; Moser, K.S. *et al.* 2008. Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in binational communities, United States. *Emerging Infectious Diseases*. **14** (6), 909-916.
- Rodwell, T.C.; Kapasi, A.J.; Barnes, R.F.W. *et al.* 2012. Factors associated with genotype clustering of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in an ethnically diverse region of southern California, United States. *Infection, Genetics and Evolution*. **12** (8), 1917-1925.
- Roetzer, A.; Diel, R.; Kohl, T.A. *et al.* 2013. Whole genome sequencing versus traditional genotyping for investigation of a *Mycobacterium tuberculosis* outbreak: a longitudinal molecular epidemiological study. *PLoS Medicine*. **10** (2), e1001387.
- Rogall, T.; Wolters, J.; Flohr, T. *et al.* 1990. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **40** (4), 323-330.
- Roig, P.; Ortí, A.; Navarro, V. *et al.* 1999. *Mycobacterium bovis* infections in HIV patients: Report of four cases in Spain. *European Journal of Internal Medicine*. **10** (1), 45-48.
- Romero, B.; Aranaz, A.; de Juan, L. *et al.* 2006. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates with the same spoligotyping profile as isolates from animals. *Journal of Clinical Microbiology*. **44** (9), 3405-3408.
- Romero, B.; Aranaz, A.; Sandoval, A. *et al.* 2008. Persistence and molecular evolution of *Mycobacterium bovis* population from cattle and wildlife in Doñana National Park revealed by genotype variation. *Veterinary Microbiology*. **132** (1-2), 87-95.
- Roring, S.; Brittain, D.; Bunschoten, A.E. *et al.* 1998. Spacer oligotyping of *Mycobacterium bovis* isolates compared to typing by restriction fragment length polymorphism using PGRS, DR and IS6110 probes. *Veterinary Microbiology*. **61** (1-2), 111-120.

- Roring, S.; Scott, A.; Brittain, D. *et al.* 2002. Development of variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology*. **40** (6), 2126-2133.
- Ross, B.C.; Raios, K.; Jackson, K. *et al.* 1991. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains by use of a nonradioactive southern blot hybridization method. *Journal of Infectious Diseases*. **163** (4), 904-907.
- Ross, B.C. y Dwyer, B. 1993. Rapid, simple method for typing isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. **31** (2), 329-334.
- Rothschild, B.M. y Martin, L.D. 2006. Did ice-age bovids spread tuberculosis? *Die Naturwissenschaften*. **93** (11), 565-569.
- Rothschild, B.M.; Martin, L.D.; Lev, G. *et al.* 2001. *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from an extinct bison dated 17000 years before the present. *Clinical Infectious Diseases*. **33** (3), 305-311.
- Rozo-Anaya, J.C. y Ribón, W. 2010. Molecular tools for *Mycobacterium tuberculosis* genotyping. *Revista de Salud Pública*. **12** (3), 510-521.
- Rubini, M.; Zaio, P. y Roberts, C. 2014. Tuberculosis and leprosy in Italy. New skeletal evidence. *HOMO- Journal of Comparative Human Biology*. **65** (1), 13-32.
- Ruddy, M.; McHugh, T.D.; Dale, J.W. *et al.* 2002. Estimation of the rate of unrecognized cross-contamination with *Mycobacterium tuberculosis* in London Microbiology Laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*. **40** (11), 4100-4104.
- Ruiz García, M.; Rodríguez, J.C.; Navarro, J.F. *et al.* 2002. Molecular epidemiology of tuberculosis in Elche, Spain: a 7-year study. *Journal of Medical Microbiology*. **51** (3), 273-277.
- Runyon, E.H. 1959. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *The Medical Clinics of North America*. **43** (1), 273-290.
- Russell, D.G.; Cardona, P.J.; Kim, M.J. *et al.* 2009. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nature immunology*. **10** (9), 943-948.
- Safi, H.; Aznar, J. y Palomares, J.C. 1997. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated during a 3-year period (1993 to 1995) in Seville, Spain. *Journal of Clinical Microbiology*. **35** (10), 2472-2476.
- Sakula, A. 1982. Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. *Thorax*. **37** (4), 246-251.
- Salo, W.L.; Aufderheide, A.C.; Buikstra, J. *et al.* 1994. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **91** (6), 2091-2094.
- Samper, S.; Martín, C.; Pinedo, A. *et al.* 1997. Transmission between HIV-infected patients of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. *AIDS*. **11** (10), 1237-1242.
- Samper, S.; Iglesias, M.J.; Rabanaque, M.J. *et al.* 1998. The molecular epidemiology of tuberculosis in Zaragoza, Spain: a retrospective epidemiological study in 1993. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **2** (4), 281-287.
- Samper, S.; Iglesias, M.J.; Rabanaque, M.J. *et al.* 2005. Systematic molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from Spain. *Journal of Clinical Microbiology*. **43** (3), 1220-1227.

- Sandgren, A.; Hollo, V. y van der Werf, M.J. 2013. Extrapulmonary tuberculosis in the European union and European economic area, 2002 to 2011. *Eurosurveillance*. **18** (12).
- Sankar, M.M.; Singh, J.; Angelin-Diana, S.C. *et al.* 2013. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from North Indian patients with extrapulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*. **93** (1), 75-83.
- Sanou, A.; Tarnagda, Z.; Kanyala, E. *et al.* 2014. *Mycobacterium bovis* in Burkina Faso: epidemiologic and genetic links between human and cattle isolates. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. **8** (10), e3142.
- Sauret, J.; Jolis, R.; Ausina, V. *et al.* 1992. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*: report of 10 cases. *Tubercle and Lung Disease*. **73** (6), 388-391.
- Schatz, A. y Waksman, S.A. 1944. Effect of streptomycin upon *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*. **57** 244-248.
- Schoch, O.D.; Pfyffer, G.E.; Buhl, D. *et al.* 2003. False-positive *Mycobacterium tuberculosis* culture revealed by restriction fragment length polymorphism analysis. *Infection*. **31** (3), 189-191.
- Schürch, A.C.; Kremer, K.; Daviena, O. *et al.* 2010a. High-resolution typing by integration of genome sequencing data in a large tuberculosis cluster. *Journal of Clinical Microbiology*. **48** (9), 3403-3406.
- Schürch, A.C.; Kremer, K.; Kiers, A. *et al.* 2010b. The tempo and mode of molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis* at patient-to-patient scale. *Infection, Genetics and Evolution*. **10** (1), 108-114.
- Schürch, A.C.; Kremer, K.; Warren, R.M. *et al.* 2011. Mutations in the regulatory network underlie the recent clonal expansion of a dominant subclone of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype. *Infection, Genetics and Evolution*. **11** (3), 587-597.
- Schürch, A.C. y van Soolingen, D. 2012. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: from phage typing to whole-genome sequencing. *Infection, Genetics and Evolution*. **12** (4), 602-609.
- Scott, A.N.; Menzies, D.; Tannenbaum, T.N. *et al.* 2005. Sensitivities and specificities of spoligotyping and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing methods for studying molecular epidemiology of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. **43** (1), 89-94.
- Shabbeer, A.; Cowan, L.S.; Ozcaglar, C. *et al.* 2012a. TB-Lineage: an online tool for classification and analysis of strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infection, Genetics and Evolution*. **12** (4), 789-797.
- Shabbeer, A.; Ozcaglar, C.; Yener, B. *et al.* 2012b. Web tools for molecular epidemiology of tuberculosis. *Infection, Genetics and Evolution*. **12** (4), 767-781.
- Shafer, R.W. y Edlin, B.R. 1996. Tuberculosis in patients infected with human immunodeficiency virus: perspective on the past decade. *Clinical Infectious Diseases*. **22** (4), 683-704.
- Shamputa, I.C.; Rigouts, L.; Eyongeta, L.A. *et al.* 2004. Genotypic and phenotypic heterogeneity among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from pulmonary tuberculosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*. **42** (12), 5528-5536.
- Shamputa, I.C.; Jugheli, L.; Sadradze, N. *et al.* 2006. Mixed infection and clonal representativeness of a single sputum sample in tuberculosis patients from a penitentiary hospital in Georgia. *Respiratory Research*. **7** (99),

- Shamputa, I.C.; Lee, J.; Allix-Béguet, C. *et al.* 2010. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a tertiary care tuberculosis hospital in south Korea. *Journal of Clinical Microbiology*. **48** (2), 387-394.
- Shang, S.; Shanley, C.A.; Caraway, M.L. *et al.* 2012. Drug treatment combined with BCG vaccination reduces disease reactivation in guinea pigs infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine*. **30** (9), 1572-1582.
- Shea, K.M.; Kammerer, J.S.; Winston, C.A. *et al.* 2014. Estimated rate of reactivation of latent tuberculosis infection in the United States, overall and by population subgroup. *American Journal of Epidemiology*. **179** (2), 216-225.
- Shen, G.; Xue, Z.; Shen, X. *et al.* 2006. Recurrent tuberculosis and exogenous reinfection, Shanghai, China. *Emerging Infectious Diseases*. **12** (11), 1776-1778.
- Shinnick, T.M. y Good, R.C. 1994. Mycobacterial taxonomy. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **13** (11), 884-901.
- Shoemaker, S.A.; Fisher, J.H.; Jones Jr., W.D. *et al.* 1986. Restriction fragment analysis of chromosomal DNA defines different strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *American Review of Respiratory Disease*. **134** (2), 210-213.
- Simpson, E.H. 1949. Measurement of diversity. *Nature*. **163** (4148), 688.
- Singh, S.P.; Salamon, H.; Lahti, C.J. *et al.* 1999. Use of pulsed-field gel electrophoresis for molecular epidemiologic and population genetic studies of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. **37** (6), 1927-1931.
- Singh, S.K.; Verma, R. y Shah, D.H. 2004. Molecular fingerprinting of clinical isolates of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* from India by restriction fragment length polymorphism (RFLP). *Journal of Veterinary Science*. **5** (4), 331-335.
- Skuce, R.A.; McCorry, T.P.; McCarroll, J.F. *et al.* 2002. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology*. **148** (2), 519-528.
- Sloot, R.; Borgdorff, M.W.; de Beer, J.L. *et al.* 2013. Clustering of tuberculosis cases based on variable-number tandem-repeat typing in relation to the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology*. **51** (7), 2427-2431.
- Small, P.M.; McClenny, N.B.; Singh, S.P. *et al.* 1993. Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis* to confirm cross-contamination in the mycobacteriology laboratory and modification of procedures to minimize occurrence of false-positive cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. **31** (7), 1677-1682.
- Small, P.M.; Hopewell, P.C.; Singh, S.P. *et al.* 1994. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco - A population-based study using conventional and molecular methods. *New England Journal of Medicine*. **330** (24), 1703-1709.
- Smit, P.W.; Haanperä, M.; Rantala, P. *et al.* 2014. Genotypic characterization and historical perspective of *Mycobacterium tuberculosis* among older and younger Finns, 2008-2011. *Clinical Microbiology and Infection*. **20** (11), 1134-1139.
- Smith, D.W. y Wiegand, E.H. 1989. What animal models can teach us about the pathogenesis of tuberculosis in humans. *Reviews of infectious diseases*. **11** (Suppl 2), S385-S393.
- Smith, N.H. 2006. A re-evaluation of *M. prototuberculosis*. *PLoS Pathogens*. **2** (9), e98.

- Smith, N.H.; Gordon, S.V.; de la Rua-Domenech, R. *et al.* 2006a. Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. *Nature Reviews Microbiology*. **4** (9), 670-681.
- Smith, N.H.; Kremer, K.; Inwald, J. *et al.* 2006b. Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Theoretical Biology*. **239** (2), 220-225.
- Smith, N.H.; Hewinson, R.G.; Kremer, K. *et al.* 2009. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews Microbiology*. **7** (7), 537-544.
- Smith, N.H. y Upton, P. 2012. Naming spoligotype patterns for the RD9-deleted lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex; www.Mbovis.org. *Infection, Genetics and Evolution*. **12** (4), 873-876.
- Soini, H.; Pan, X.; Amin, A. *et al.* 2000. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in Houston, Texas, by spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology*. **38** (2), 669-676.
- Sola, C.; Filliol, I.; Legrand, E. *et al.* 2001a. *Mycobacterium tuberculosis* phylogeny reconstruction based on combined numerical analysis with IS1081, IS6110, VNTR, and DR-based spoligotyping suggests the existence of two new phylogeographical clades. *Journal of Molecular Evolution*. **53** (6), 680-689.
- Sola, C.; Filliol, I.; Gutiérrez, M.C. *et al.* 2001b. Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*: biogeographic distribution of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives. *Emerging Infectious Diseases*. **7** (3), 390-396.
- Sola, C.; Filliol, I.; Legrand, E. *et al.* 2003. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infection, Genetics and Evolution*. **3** (2), 125-133.
- Solano, V.M.; Hernández, M.J.; Martín, J.I. *et al.* 2003. Occupational exposure to multiresistant *Mycobacterium bovis* at a hospital in Zaragoza, Spain. *Revista Española de Salud Pública*. **77** (2), 201-209.
- Solsona, J.; Caylà, J.A.; Verdú, E. *et al.* 2001. Molecular and conventional epidemiology of tuberculosis in an inner city district. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **5** (8), 724-731.
- Sonnenberg, P.; Murray, J.; Glynn, J.R. *et al.* 2001. HIV-1 and recurrence, relapse, and reinfection of tuberculosis after cure: a cohort study in South African mineworkers. *Lancet*. **358** (9294), 1687-1693.
- Sotomayor, H.; Burgos, J. y Arango, M. 2004. Demostración de tuberculosis en una momia prehispánica colombiana por la ribotipificación del ADN de *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomedica: Revista del Instituto Nacional de Salud*. **24 Supp 1** 18-26.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*. **98** (3), 503-517.
- Spigelman, M. y Lemma, E. 1993. The use of the polymerase chain reaction (PCR) to detect *Mycobacterium tuberculosis* in ancient skeletons. *International Journal of Osteoarchaeology*. **3** (2), 137-143.
- Sreevatsan, S.; Pan, X.; Stockbauer, K.E. *et al.* 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **94** (18), 9869-9874.
- Stahl, D.A. y Urbance, J.W. 1990. The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *Journal of Bacteriology*. **172** (1), 116-124.

- Stead, W.W.; Eisenach, K.D.; Cave, M.D. *et al.* 1995. When did *Mycobacterium tuberculosis* infection first occur in the New World? An important question with public health implications. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **151** (4), 1267-1268.
- Steinbock, R.T. 1976. Paleopathological diagnosis and interpretation: bone disease in ancient human populations. 1ª ed. Charles C. Thomas Pub Ltd, Springfield.
- Stewart, G.R.; Robertson, B.D. y Young, D.B. 2003. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nature Reviews Microbiology*. **1** (2), 97-105.
- Stone, A.C.; Wilbur, A.K.; Buikstra, J.E. *et al.* 2009. Tuberculosis and leprosy in perspective. *American Journal of Physical Anthropology*. **140** (SUPPL. 49), 66-94.
- Stone, M.J.; Brown, T.J. y Drobniowski, F.A. 2012. Human *Mycobacterium bovis* infections in London and Southeast England. *Journal of Clinical Microbiology*. **50** (1), 164-165.
- Streicher, E.M.; Victor, T.C.; van der Spuy, G.D. *et al.* 2007. Spoligotype signatures in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Clinical Microbiology*. **45** (1), 237-240.
- Stucki, D. y Gagneux, S. 2013. Single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* and the need for a curated database. *Tuberculosis*. **93** (1), 30-39.
- Stucki, D.; Malla, B.; Hostettler, S. *et al.* 2012. Two new rapid SNP-typing methods for classifying *Mycobacterium tuberculosis* complex into the main phylogenetic lineages. *PLoS ONE*. **7** (7), e41253.
- Styblo, K. 1990. The elimination of tuberculosis in the Netherlands. *Bulletin of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. **65** (2-3), 49-55.
- Subdirección de Epidemiología del Servicio Extremeño de Salud 2013. Estudio epidemiológico sobre la tuberculosis en Extremadura entre 2004 y 2012.
- Sunder, S.; Lanotte, P.; Godreuil, S. *et al.* 2009. Human-to-human transmission of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in immunocompetent patients. *Journal of Clinical Microbiology*. **47** (4), 1249-1251.
- Supply, P.; Magdalena, J.; Himpens, S. *et al.* 1997. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Molecular Microbiology*. **26** (5), 991-1003.
- Supply, P.; Mazars, E.; Lesjean, S. *et al.* 2000. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular Microbiology*. **36** (3), 762-771.
- Supply, P.; Lesjean, S.; Savine, E. *et al.* 2001. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *Journal of Clinical Microbiology*. **39** (10), 3563-3571.
- Supply, P.; Warren, R.M.; Bañuls, A.L. *et al.* 2003. Linkage disequilibrium between minisatellite loci supports clonal evolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a high tuberculosis incidence area. *Molecular Microbiology*. **47** (2), 529-538.
- Supply, P. 2005. Multilocus variable number tandem repeat genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*: Technical guide. *Institut de Biologie/Institut Pasteur de Lille*. Disponible en línea: <http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/files/MIRU-VNTRtypingmanualv6.pdf>.
- Supply, P. 2006. Protocol and guidelines for multilocus variable number tandem repeat genotyping of *M. bovis* VENoMYC (Veterinary Network of Laboratories Researching into Improved Diagnosis and Epidemiology of Mycobacterial Diseases). *WP7 Workshop, 19 to 22 October 2006, Toledo, Spain*. WP7 Workshop VENoMYC Coordination Action EU (SSPE-CT-2004-501903), 15-16.

- Supply, P.; Allix, C.; Lesjean, S. *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** (12), 4498-4510.
- Svensson, E.; Millet, J.; Lindqvist, A. *et al.* 2011. Impact of immigration on tuberculosis epidemiology in a low-incidence country. *Clinical Microbiology and Infection*. **17** (6), 881-887.
- Tanaka, M.M. y Francis, A.R. 2005. Methods of quantifying and visualising outbreaks of tuberculosis using genotypic information. *Infection, Genetics and Evolution*. **5** (1), 35-43.
- Tang, C.; Reyes, J.F.; Luciani, F. *et al.* 2008. spolTools: Online utilities for analyzing spoligotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Bioinformatics*. **24** (20), 2414-2415.
- Taylor, G.M.; Young, D.B. y Mays, S.A. 2005. Genotypic analysis of the earliest known prehistoric case of tuberculosis in Britain. *Journal of Clinical Microbiology*. **43** (5), 2236-2240.
- Taylor, G.M.; Mays, S.A. y Huggett, J.F. 2010. Ancient DNA (aDNA) studies of man and microbes: general similarities, specific differences. *International Journal of Osteoarchaeology*. **20** (6), 747-751.
- Taylor, J.L.; Turner, O.C.; Basaraba, R.J. *et al.* 2003. Pulmonary necrosis resulting from DNA vaccination against tuberculosis. *Infection and Immunity*. **71** (4), 2192-2198.
- Te Beek, L.A.M.; van Der Werf, M.J.; Richter, C. *et al.* 2006. Extrapulmonary tuberculosis by nationality, the Netherlands, 1993-2001. *Emerging Infectious Diseases*. **12** (9), 1375-1382.
- Tenover, F.C.; Arbeit, R.D.; Goering, R.V. *et al.* 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*. **33** (9), 2233-2239.
- Theisen, A.; Reichel, C.; Rusch-Gerdes, S. *et al.* 1995. Mixed-strain infection with a drug-sensitive and multidrug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*. **345** (8963), 1512-1513.
- Thierry, D.; Brisson-Noel, A.; Vincent-Levy-Frebault, V. *et al.* 1990a. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*. **28** (12), 2668-2673.
- Thierry, D.; Cave, M.D.; Eisenach, K.D. *et al.* 1990b. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Research*. **18** (1), 188.
- Thong-On, A.; Smittipat, N.; Juthayothin, T. *et al.* 2010. Variable-number tandem repeats typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 in Thailand. *Tuberculosis*. **90** (1), 9-15.
- Thwaites, G.; Caws, M.; Chau, T.T.H. *et al.* 2008. Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* genotype and the clinical phenotype of pulmonary and meningeal tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. **46** (4), 1363-1368.
- Tortoli, E. 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clinical Microbiology Reviews*. **16** (2), 319-354.
- Tortoli, E.; Rindi, L.; Garcia, M.J. *et al.* 2004. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **54** (4), 1277-1285.
- Tortoli, E. 2006. The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. **48** (2), 159-178.

- Tortoli, E. 2009. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. *Clinical Microbiology and Infection*. **15** (10), 906-910.
- Tran, T.; Aboudharam, G.; Raoult, D. *et al.* 2011. Beyond ancient microbial DNA: nonnucleotidic biomolecules for paleomicrobiology. *BioTechniques*. **50** (6), 370-380.
- Tsolaki, A.G.; Hirsh, A.E.; DeRiemer, K. *et al.* 2004. Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: Insights from genomic deletions in 100 strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101** (14), 4865-4870.
- Tsolaki, A.G.; Gagneux, S.; Pym, A.S. *et al.* 2005. Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. **43** (7), 3185-3191.
- Tudó, G.; Rey, E.; Borrell, S. *et al.* 2010. Characterization of mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the area of Barcelona. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **65** (11), 2341-2346.
- van Crevel, R.; Ottenhoff, T.H.M. y van der Meer, J.W.M. 2002. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical microbiology reviews*. **15** (2), 294-309.
- van Crevel, R.; Parwati, I.; Sahiratmadja, E. *et al.* 2009. Infection with *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains is associated with polymorphisms in SLC11A1/NRAMP1 in Indonesian patients with tuberculosis. *Journal of Infectious Diseases*. **200** (11), 1671-1674.
- van der Zanden, A.G.M.; Kremer, K.; Schouls, L.M. *et al.* 2002. Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. *Journal of Clinical Microbiology*. **40** (12), 4628-4639.
- van Deutekom, H.; Hoijng, S.P.; de Haas, P.E.W. *et al.* 2004. Clustered tuberculosis cases: do they represent recent transmission and can they be detected earlier? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **169** (7), 806-810.
- van Duin, J.M.; Pijnenburg, J.E.M.; van Rijswoud, C.M. *et al.* 1998. Investigation of cross contamination in a *Mycobacterium tuberculosis* laboratory using IS6110 DNA fingerprinting. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **2** (5), 425-429.
- van Embden, J.D.A.; Cave, M.D.; Crawford, J.T. *et al.* 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *Journal of Clinical Microbiology*. **31** (2), 406-409.
- van Embden, J.D.A.; van Gorkom, T.; Kremer, K. *et al.* 2000. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Journal of Bacteriology*. **182** (9), 2393-2401.
- van Ingen, J.; Rahim, Z.; Mulder, A. *et al.* 2012. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerging Infectious Diseases*. **18** (4), 653-655.
- van Rie, A.; Warren, R.; Richardson, M. *et al.* 1999. Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *New England Journal of Medicine*. **341** (16), 1174-1179.
- van Rie, A.; Victor, T.C.; Richardson, M. *et al.* 2005. Reinfection and mixed infection cause changing *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance patterns. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **172** (5), 636-642.

- van Soolingen, D.; Hermans, P.W.M.; de Haas, P.E.W. *et al.* 1992. Insertion element IS1081-associated restriction fragment length polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex species: A reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of Clinical Microbiology*. **30** (7), 1772-1777.
- van Soolingen, D.; de Haas, P.E.W.; Hermans, P.W.M. *et al.* 1993. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. **31** (8), 1987-1995.
- van Soolingen, D.; Hoogenboezem, T.; de Haas, P.E.W. *et al.* 1997. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *canetti*: characterization of an exceptional isolate from Africa. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **47** (4), 1236-1245.
- van Soolingen, D.; Borgdorff, M.W.; de Haas, P.E.W. *et al.* 1999. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997. *Journal of Infectious Diseases*. **180** (3), 726-736.
- van Soolingen, D. 2001. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *Journal of Internal Medicine*. **249** (1), 1-26.
- van Soolingen, D. 2014. Whole-genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* as an epidemiological marker. *The Lancet Respiratory Medicine*. **2** (4), 251-252.
- Verver, S.; Warren, R.M.; Munch, Z. *et al.* 2004. Proportion of tuberculosis transmission that takes place in households in a high-incidence area. *Lancet*. **363** (9404), 212-214.
- Verver, S.; Warren, R.M.; Beyers, N. *et al.* 2005. Rate of reinfection tuberculosis after successful treatment is higher than rate of new tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **171** (12), 1430-1435.
- Vilaplana, C. y Cardona, P.J. 2014. The lack of a big picture in tuberculosis: The clinical point of view, the problems of experimental modeling and immunomodulation. The factors we should consider when designing novel treatment strategies. *Frontiers in Microbiology*. **5** (FEB).
- Villemin, J.A. 1865. Cause et nature de la tuberculose: son inoculation de l'homme au lapin. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. **61** 1012-1015.
- Vitol, I.; Driscoll, J.; Kreiswirth, B. *et al.* 2006. Identifying *Mycobacterium tuberculosis* complex strain families using spoligotypes. *Infection, Genetics and Evolution*. **6** (6), 491-504.
- Vynnycky, E.; Borgdorff, M.W.; Leung, C.C. *et al.* 2008. Limited impact of tuberculosis control in Hong Kong: attributable to high risks of reactivation disease. *Epidemiology and Infection*. **136** (7), 943-952.
- Wagner, J.C.; Buchanan, G.; Bokkenheuser, V. *et al.* 1958. An acid-fast bacillus isolated from the lungs of the cape hyrax, *Procavia capensis* (pallas). *Nature*. **181** (4604), 284-285.
- Walker, T.M.; Ip, C.L.C.; Harrell, R.H. *et al.* 2013. Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. *The Lancet Infectious Diseases*. **13** (2), 137-146.
- Walker, T.M.; Lalor, M.K.; Broda, A. *et al.* 2014. Assessment of *Mycobacterium tuberculosis* transmission in Oxfordshire, UK, 2007-12, with whole pathogen genome sequences: an observational study. *The Lancet Respiratory Medicine*. **2** (4), 285-292.
- Wamala, D.; Asiiimwe, B.; Kigozi, E. *et al.* 2014. Clinico-pathological features of tuberculosis due to *Mycobacterium tuberculosis* Uganda genotype in patients with tuberculous lymphadenitis: a cross sectional study. *BMC Clinical Pathology*. **14** (1).

- Wan, K.; Liu, J.; Hauck, Y. *et al.* 2011. Investigation on *Mycobacterium tuberculosis* diversity in China and the origin of the Beijing clade. *PLoS ONE*. **6** (12), e29190.
- Warren, R.M.; Streicher, E.M.; Sampson, S.L. *et al.* 2002. Microevolution of the direct repeat region of *Mycobacterium tuberculosis*: Implications for interpretation of spoligotyping data. *Journal of Clinical Microbiology*. **40** (12), 4457-4465.
- Wayne, L.G. 1981. Numerical taxonomy and cooperative studies: roles and limits. *Reviews of Infectious Diseases*. **3** (5), 822-828.
- Weis, S.E.; Pogoda, J.M.; Yang, Z. *et al.* 2002. Transmission dynamics of tuberculosis in Tarrant County, Texas. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **166** (1), 36-42.
- Weiss, R.A. y McMichael, A.J. 2004. Social and environmental risk factors in the emergence of infectious diseases. *Nature Medicine*. **10** (12 SUPPL.), S70-S76.
- Wells, A.Q. y Oxon, D.M. 1937. Tuberculosis in wild voles. *Lancet*. **229** (5934), 1221.
- Weniger, T.; Krawczyk, J.; Supply, P. *et al.* 2010. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic Acids Research*. **38** (SUPPL. 2), W326-W331.
- Wilbur, A.K. y Buikstra, J.E. 2006. Patterns of tuberculosis in the Americas - How can modern biomedicine inform the ancient past? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. **101** (SUPPL. 2), 59-66.
- Wilson, L.G. 1990. The historical decline of tuberculosis in Europe and America: Its causes and significance. *Journal of the history of medicine and allied sciences*. **45** (3), 366-396.
- Wilson, S.M.; Goss, S. y Drobniewski, F. 1998. Evaluation of strategies for molecular fingerprinting for use in the routine work of a *Mycobacterium* reference unit. *Journal of Clinical Microbiology*. **36** (11), 3385-3388.
- Wirth, T.; Hildebrand, F.; Allix-Béguet, C. *et al.* 2008. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PLoS Pathogens*. **4** (9), e1000160.
- Wolfe, N.D.; Dunavan, C.P. y Diamond, J. 2007. Origins of major human infectious diseases. *Nature*. **447** (7142), 279-283.
- Woolhouse, M.E.J.; Webster, J.P.; Domingo, E. *et al.* 2002. Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. *Nature genetics*. **32** (4), 569-577.
- World Health Organization. 2010. The global plan to stop TB 2011-2015: transforming the fight towards elimination of tuberculosis.
- World Health Organization. 2013. Global tuberculosis report 2013. 17.
- Xing, L.; Liu, R.; Li, Q. *et al.* 2012. Clinical and genotypic characteristics of childhood tuberculosis in Chongqing, China. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **31** (8), 1735-1739.
- Yang, Z.H.; Ijaz, K.; Bates, J.H. *et al.* 2000. Spoligotyping and polymorphic GC-rich repetitive sequence fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains having few copies of IS6110. *Journal of Clinical Microbiology*. **38** (10), 3572-3576.
- Yokoyama, E.; Kishida, K.; Uchimura, M. *et al.* 2006. Comparison between agarose gel electrophoresis and capillary electrophoresis for variable numbers of tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Microbiological Methods*. **65** (3), 425-431.

- Yokoyama, E. 2007. Improved differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains, including many Beijing genotype strains, using a new combination of variable number of tandem repeats loci. *Infection, Genetics and Evolution*. **7** (4), 499-508.
- Young, D.B. y Stewart, G.R. 2002. Tuberculosis vaccines. *British Medical Bulletin*. **62**, 73-86.
- Young, D.B.; Gideon, H.P. y Wilkinson, R.J. 2009. Eliminating latent tuberculosis. *Trends in microbiology*. **17** (5), 183-188.
- Yuen, K.Y.; Chan, C.M.; Chan, K.S. *et al.* 1995. IS6110 based amplotyping assay and RFLP fingerprinting of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Pathology*. **48** (10), 924-928.
- Zaczek, A.; Brzostek, A.; Kuron, A. *et al.* 2014a. Development of a new ligation-mediated PCR method for the differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. **18** (3), 302-309.
- Zaczek, A.; Brzostek, A.; Wojtasik, A. *et al.* 2014b. Comparison of ligation-mediated PCR methods in differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *BioMed Research International*. **2014** (722071), 1-4.
- Zhang, J.; Abadia, E.; Refregier, G. *et al.* 2010. *Mycobacterium tuberculosis* complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and discriminative power of 'spoligotyping' with new spacers and a microbead-based hybridization assay. *Journal of Medical Microbiology*. **59** (3), 285-294.
- Zhang, X.; Zhao, B.; Liu, L. *et al.* 2012. Subpopulation analysis of heteroresistance to fluoroquinolone in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Beijing, China. *Journal of Clinical Microbiology*. **50** (4), 1471-1474.
- Zhang, Y.; Wallace Jr., R.J. y Mazurek, G.H. 1995. Genetic differences between BCG substrains. *Tubercle and Lung Disease*. **76** (1), 43-50.
- Zink, A.R.; Grabner, W.; Reischl, U. *et al.* 2003a. Molecular study on human tuberculosis in three geographically distinct and time delineated populations from ancient Egypt. *Epidemiology and Infection*. **130** (2), 239-249.
- Zink, A.R.; Sola, C.; Reischl, U. *et al.* 2003b. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology*. **41** (1), 359-367.
- Zink, A.R.; Molnár, E.; Motamedi, N. *et al.* 2007. Molecular history of tuberculosis from ancient mummies and skeletons. *International Journal of Osteoarchaeology*. **17** (4), 380-391.
- Zopf, W. 1883. Die Spaltpilze. Edward Trewendt, Breslau.