



Universitat de València

TESIS DOCTORAL

**“Estudio de la distribución clonal de aislados
clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* complex
mediante técnicas genotípicas en el área de
influencia del Consorcio Hospital General
Universitario de Valencia”**

Por

RAFAEL MEDINA GONZÁLEZ

Licenciado en Farmacia

Especialista en Microbiología y Parasitología

Directoras

Dra. MARÍA DEL REMEDIO GUNA SERRANO

Dra. CONCEPCIÓN GIMENO CARDONA

Facultad de Medicina y Odontología

Valencia, junio de 2019

Programa de doctorado 3139 MEDICINA.

Línea de Investigación: MICROBIOLOGÍA CLÍNICA.

Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina. Universitat de València.

“Estudio de la distribución clonal de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* complex mediante técnicas genotípicas en el área de influencia del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia”

Por

RAFAEL MEDINA GONZÁLEZ

Licenciado en Farmacia

Especialista en Microbiología y Parasitología

Directoras

Dra. MARÍA DEL REMEDIO GUNA SERRANO

Responsable de la Sección de Micobacterias. Servicio de Microbiología.
Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

Profesora asociada asistencial del Departamento de Microbiología.
Facultad de Medicina. Universitat de València.

Dra. CONCEPCIÓN GIMENO CARDONA

Jefa del Servicio de Microbiología.
Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

Profesora del Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina.
Universitat de València.

Las Doctoras Dña. MARÍA DEL REMEDIO GUNA SERRANO y Dña. CONCEPCIÓN GIMENO CARDONA.

HACEN CONSTAR

Que la tesis doctoral titulada: "Estudio de la distribución clonal de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* complex mediante técnicas genotípicas en el área de influencia del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia", presentada por D. RAFAEL MEDINA GONZÁLEZ, Licenciado en Farmacia y Especialista en Microbiología y Parasitología, para la obtención del doctorado por la Universitat de València ha sido realizada bajo su dirección y reúne las condiciones necesarias para su presentación y defensa ante el Tribunal correspondiente.

Las directoras:



Dra. Dña. María del Remedío Guna Serrano



Dra. Dña. CONCEPCIÓN GIMENO CARDONA

Valencia, 18 de junio de 2019.

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo no habría sido posible sin todas aquellas personas que han colaborado y apoyado este proyecto tanto de forma directa como indirecta. A quienes quiero expresar mi gratitud por su ayuda y apoyo.

En primer lugar, a mis directoras de Tesis, la Dra. María del Remedio Guna y la Dra. Concepción Gimeno, por el tiempo dedicado, su paciencia y sus consejos.

En segundo lugar, a la Dra. Ana Patricia Jiménez, quién abrió camino en nuestro servicio con la tipificación molecular del MTBC. A quién agradezco los consejos iniciales sobre la materia.

Agradezco a la Fundación de Investigación del HGUV (FIHGUV) la concesión de uno de los premios López-Trigo del año 2014 a la Dra. María del Remedio Guna, con el cual se pudo financiar este proyecto.

Me gustaría también agradecer a todo el grupo de la Unidad Genómica de la Tuberculosis del Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC) su colaboración y consejo. En especial al Dr. Iñaki Comas, Manoli Torres y sobre todo a Irving Cancino, por su inestimable ayuda, consejo y paciencia a la hora de resolver mis dudas.

Agradecer también la ayuda de la Dra. María Teresa Sanz en las correcciones estadísticas y a la Dra. Carme Salvador por facilitarme su contacto.

Al personal del Servicio de Microbiología del CHGUV, en especial a mi querida María José Lahiguera por su ayuda, y que junto a Reme son el alma de la Sección de Micobacterias. También a Mari Carmen por su paciencia a la hora de compartir el espacio de trabajo.

Y no me puedo olvidar de mi familia: mi mujer Irene y mi hija Alba, mis padres, mi hermana, mis suegros y mi cuñada, que sin su apoyo y ayuda no habría podido concluir este proyecto.

Resumen

La tuberculosis sigue siendo un importante problema sanitario y de salud pública a escala mundial. Por esta razón se han establecido estrategias que contribuyen a mejorar los procesos de control y vigilancia de esta enfermedad, basadas en el estudio epidemiológico molecular del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. En las últimas dos décadas han surgido múltiples técnicas de genotipificación aplicadas a este microorganismo, permitiendo discriminar el origen clonal de los aislados clínicos en distintos contextos.

El objetivo principal de este estudio es la caracterización molecular de 154 aislados clínicos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en el Departamento de Salud Valencia - Hospital General durante los años 2009 a 2015. Para ello se empleó la técnica MIRU-VNTR de 24 *loci*, permitiendo la identificación de cepas agrupadas en complejos clonales que podrían estar relacionados con cadenas de transmisión. Además, se estudiaron las variables demográficas y clínicas de los casos en función de si las cepas se agruparon o no en complejos clonales. También se comparó el poder discriminatorio obtenido con esta técnica respecto a la de 15 *loci* ($n = 154$, más un control positivo) y a la genotipificación mediante secuenciación de genoma completo ($n = 55$, de las 155), así como la asignación de linajes y sub-linajes mediante estas técnicas. Por otro lado, en los casos en que se detectó resistencia fenotípica a alguno de los fármacos antituberculosos de primera línea, se realizó un estudio genotípico para identificar las mutaciones causantes de dicha resistencia.

La distribución poblacional de las cepas estudiadas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante MIRU-VNTR de 24 *loci* se mostró agrupada en un 50,3% ($n = 78$) empleando como umbral una diferencia máxima entre cepas de dos *loci*, las cuales se encontraban distribuidas en veintidós complejos clonales con un mínimo de dos cepas y un máximo de doce. El porcentaje de cepas agrupadas se redujo al 40,0% al utilizar el umbral de como máximo un *locus* y al 30,3% cuando presentaron el mismo mirutipo. El patrón mayoritario de los casos en función de la agrupación o no de las cepas con el umbral de como máximo 2 *loci* fue similar en ambos grupos: varón de entre 30 - 44 años de origen español, VIH negativo y diagnosticado de tuberculosis pulmonar. Sin embargo, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el origen de los pacientes, la forma de presentación de la enfermedad y el linaje de las cepas.

Al comparar la técnica MIRU-VNTR de 24 *loci* respecto a la de 15 *loci*, estratificando por el umbral establecido, el poder discriminatorio siempre fue superior con la primera. El mejor poder discriminatorio lo obtuvo la técnica con 24 *loci* tomando como umbral el mismo mirutipo (HGDI = 0,9970). En cuanto a la comparación con la secuenciación de genoma completo, a pesar de que esta última presenta un poder de resolución muy superior al de la técnica MIRU-VNTR, el poder discriminatorio obtenido con la técnica MIRU-VNTR

Resumen

de 24 *loci* con el umbral de idéntico mirutipo fue de 0,9933, superior al de la secuenciación (HGDI = 0,9838).

Por lo que respecta a la asignación de linajes/sub-linajes, la concordancia del tipado mediante MIRU-VNTR 24-*loci* respecto al tipado de SNP fue del 94,1% (143/152). Las cepas estudiadas pertenecen fundamentalmente a tres linajes: el linaje 4.1.2 o Haarlem (35,7%), el linaje 4.3 o LAM (25,3%) y el linaje 4.10 o PGG3 (20,1%).

Mediante el método fenotípico se detectaron un 6,45% de cepas resistentes a isoniazida, un 3,23% a estreptomycinina y un 0,65% a pirazinamida. El porcentaje de cepas con polirresistencia fue del 1,94% y no se detectaron cepas MDR con esta metodología. Sin embargo, en el subgrupo de 55 cepas estudiadas mediante secuenciación sí se detectó una cepa MDR y dos con monorresistencia a rifampicina. También se detectó adicionalmente una cepa resistente a etambutol y otra a pirazinamida, pero no detectó una resistencia a estreptomycinina.

Los resultados obtenidos mediante MIRU-VNTR son buenos respecto a los obtenidos mediante la secuenciación de genoma completo. No obstante, la secuenciación presenta ventajas adicionales tanto a nivel epidemiológico y de filogenia, como en cuanto a la predicción de la sensibilidad genotípica frente a los antituberculosos, tanto de primera como de segunda línea.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, técnicas de genotipaje, MIRU-VNTR, secuenciación de genoma completo, linajes, epidemiología molecular.

Abstract

Tuberculosis remains a major public health problem worldwide. For this reason, strategies have been established to contribute to the improvement of the control and surveillance processes of this disease, based on the molecular epidemiological study of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. In the last two decades, multiple genotyping techniques have been applied to this microorganism, allowing to determine the clonal origin of clinical isolates in different backgrounds.

The main objective of this study is the molecular characterization of 154 clinical isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in the “Departamento de Salud Valencia - Hospital General” during the years 2009 to 2015. In order to do so, the MIRU-VNTR technique of 24 *loci* was used, allowing the identification of strains assembled in clonal complexes that could be related to transmission chains. In addition, the demographic and clinical variables of the cases were studied according to whether the strains were gathered or not in clonal complexes. We also compared the discriminatory power obtained with this technique to the one of 15 *loci* (n = 154, plus a positive control) and to genotyping by complete genome sequencing (n = 55, of the 155), as well as the assignment of lineages and sub-lineages using these techniques. On the other hand, in those cases in which phenotypic resistance was detected to one of the first-line antituberculosis drugs, a genotypic study was carried out to identify the mutations causing this resistance.

The population distribution of the strains studied of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by means of MIRU-VNTR of 24 *loci* was the following: 50.3% (n = 78) of the strains were congregated in clonal complexes with one or more strains, using as threshold a maximum difference between strains of two *loci*, which were distributed in twenty-two clonal complexes with a minimum of two strains and a maximum of twelve. The percentage of collected strains was reduced to 40.0% when using the threshold of maximum one *locus* difference and to 30.3% when they presented the same mirutype. The most common pattern in terms of the grouping, or lack of it, of the strains with a maximum of two different *loci* was similar in both groups: male between 30 - 44 years of Spanish origin with pulmonary tuberculosis and HIV negative. However, there were statistically significant differences in the origin of the patients, the form of presentation of the disease and the lineage of the strains.

When comparing the MIRU-VNTR technique of 24 *loci* with respect to that of 15 *loci*, stratifying by the established threshold, the discriminatory power was always superior with the first one. The best discriminatory power was obtained by the technique with 24 *loci* taking as the threshold the same mirutype (HGDI = 0.9970). Regarding the comparison with the complete genome sequencing, although the latter one has a resolution power much higher than that of the MIRU-VNTR technique, the discriminatory power obtained with the MIRU-VNTR technique of 24 *loci* with the threshold of

Abstract

identical mirutype was 0.9933, higher than the one of sequencing (HGDI = 0.9838).

With regard to the allocation of lineages/sub-lineages, the concordance of the typing by MIRU-VNTR 24-*loci* with respect to SNP typing was 94.1% (143/152). The strains studied belonged mainly to three lineages: lineage 4.1.2 or Haarlem (35.7%), lineage 4.3 or LAM (25.3%) and lineage 4.10 or PGG3 (20.1%).

The phenotypic method detected 6.45% of strains resistant to isoniazid, 3.23% to streptomycin and 0.65% to pyrazinamide. The percentage of strains with polyresistance was 1.94% and no MDR strains were detected with this methodology. However, in the subgroup of 55 strains studied by sequencing, one MDR strain was detected and two with monoresistance to rifampicin. A strain resistant to ethambutol and another to pyrazinamide was also detected, but resistance to streptomycin was not detected.

The results obtained by MIRU-VNTR are good compared to those obtained by sequencing the complete genome. However, sequencing has additional advantages at the epidemiological and phylogeny level, as well as in the prediction of genotypic susceptibility to antituberculosis drugs, both first and second line.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, genotyping techniques, MIRU-VNTR, complete genome sequencing, lineages, molecular epidemiology.

Resum

La tuberculosi continua sent un important problema sanitari i de salut pública a escala mundial. Per aquesta raó s'han establert estratègies que contribueixen a millorar els processos de control i vigilància d'aquesta malaltia, basades en l'estudi epidemiològic molecular del complex *Mycobacterium tuberculosis*. En les últimes dues dècades han sorgit múltiples tècniques de genotipatge aplicades a aquest microorganisme, permetent discriminar l'origen clonal dels aïllats clínics en diferents contextos.

L'objectiu principal d'aquest estudi és la caracterització molecular de 154 aïllats clínics del complex *Mycobacterium tuberculosis* al Departament de Salut València - Hospital General durant els anys 2009 a 2015. Per això es va emprar la tècnica MIRU-VNTR de 24 *loci*, permetent la identificació de soques agrupades en complexos clonals que podrien estar relacionats amb cadenes de transmissió. A més, es van estudiar les variables demogràfiques i clíniques dels casos en funció de si les soques es van agrupar o no en complexos clonals. També es va comparar el poder discriminatori obtingut amb aquesta tècnica respecte a la de 15 *loci* ($n = 154$, més un control positiu) i a la genotipificació mitjançant seqüenciació de genoma complet ($n = 55$, de les 155), així com l'assignació de llinatges i sub-llinatges mitjançant aquestes tècniques. D'altra banda, en els casos en què es va detectar resistència fenotípica a algun dels fàrmacs antituberculosos de primera línia, es va realitzar un estudi genotípic per a identificar les mutacions causants d'aquesta resistència.

La distribució poblacional de les soques estudiades del complex *Mycobacterium tuberculosis* mitjançant MIRU-VNTR de 24 *loci* es va mostrar agrupada en un 50,3% ($n = 78$) emprant com a llinar una diferència màxima entre soques de dos *loci*, les quals es trobaven distribuïdes en vint-i-dos complexos clonals amb un mínim de dos soques i un màxim de dotze. El percentatge de soques agrupades es va reduir al 40,0% en utilitzar el punt de tall de com a màxim un *locus* i al 30,3% quan van presentar el mateix mirutip. El patró majoritari dels casos en funció de l'agrupació o no de les soques amb el llinar de com a màxim dos *loci* va ser similar en tots dos grups: home de 30 - 44 anys d'origen espanyol, VIH negatiu i diagnosticat de tuberculosi pulmonar. No obstant això, sí que es van trobar diferències estadísticament significatives en l'origen dels pacients, la forma de presentació de la malaltia i el llinatge de les soques.

En comparar la tècnica MIRU-VNTR de 24 *loci* respecte a la de 15 *loci*, estratificant pel llinar establert, el poder discriminatori sempre va ser superior amb la primera. El millor poder discriminatori el va obtenir la tècnica amb 24 *loci* prenent com a punt de tall el mateix mirutip (HGDI = 0,9970). Quant a la comparació amb la seqüenciació de genoma complet, a pesar que aquesta última presenta un poder de resolució molt superior al de la tècnica MIRU-VNTR, el poder discriminatori obtingut amb la tècnica MIRU-VNTR de 24

Resum

loci amb el llinard d'ídentic mirutip va ser de 0,9933, superior al de la seqüenciació (HGDI = 0,9838).

Pel que respecta a l'assignació de llinatges/sub-llinatges, la concordança del tipatge mitjançant MIRU-VNTR 24-*loci* respecte al tipatge de SNP va ser del 94,1% (143/152). Les soques estudiades pertanyen fonamentalment a tres llinatges: el llinatge 4.1.2 o Haarlem (35,7%), el llinatge 4.3 o LAM (25,3%) i el llinatge 4.10 o PGG3 (20,1%).

Mitjançant el mètode fenotípic es van detectar un 6,45% de soques resistents a isoniazida, un 3,23% a estreptomycinina i un 0,65% a pirazinamida. El percentatge de soques amb polirresistència va ser del 1,94% i no es van detectar soques MDR amb aquesta metodologia. No obstant això, en el subgrup de 55 soques estudiats mitjançant seqüenciació sí que es va detectar una soca MDR i dos amb monorresistència a rifampicina. També es va detectar addicionalment una soca resistent a etambutol i una altra a pirazinamida, però no va detectar una resistència a estreptomycinina.

Els resultats obtinguts mitjançant MIRU-VNTR són bons respecte als obtinguts mitjançant la seqüenciació de genoma complet. No obstant això, la seqüenciació presenta avantatges addicionals tant a nivell epidemiològic i de filogènia, com quant a la predicció de la sensibilitat genotípica enfront dels antituberculosos, tant de primera com de segona línia.

Paraules clau: *Mycobacterium tuberculosis*, tècniques de genotipatge, MIRU-VNTR, seqüenciació de genoma complet, llinatges, epidemiologia molecular.

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS	9
LISTADO DE TABLAS	13
LISTADO DE FIGURAS	16
1 INTRODUCCIÓN	27
1.1 Contexto actual de la tuberculosis	29
1.1.1 Ámbito mundial	30
1.1.2 Ámbito europeo	38
1.1.3 Ámbito nacional	43
1.1.4 Comunitat Valenciana	46
1.1.5 Departamento de Salud Valencia – Hospital General	46
1.2 Aspectos microbiológicos	47
1.3 El complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	48
1.4 Filogenia del MTBC	50
1.5 Transmisión, patogenia e inmunidad	53
1.6 Aspectos clínicos de la tuberculosis	56
1.6.1 Tuberculosis pulmonar	56
1.6.2 Tuberculosis extrapulmonar	57
1.6.2.1 Linfadenitis tuberculosa	57
1.6.2.2 Pleuritis tuberculosa	57
1.6.2.3 Tuberculosis genitourinaria	57
1.6.2.4 Osteomielitis tuberculosa	57
1.6.2.5 Meningitis tuberculosa	58
1.6.2.6 Tuberculosis diseminada o miliar	58
1.6.2.7 Serositis, pericarditis y peritonitis	58
1.6.2.8 Tuberculosis cutánea	58
1.7 Diagnóstico de la tuberculosis	58
1.7.1 Diagnóstico Clínico	59
1.7.1.1 Semiología	59
1.7.1.2 Examen físico	59
1.7.1.3 Hallazgos radiológicos	60
1.7.2 Diagnóstico Microbiológico	61
1.7.2.1 Tipos de muestras	61

Índice

1.7.2.2	Técnicas de microscopía	62
1.7.2.3	Técnicas de cultivo.....	64
1.7.2.3.1	Pretratamiento	65
1.7.2.3.2	Medios de cultivo	65
1.7.2.3.3	Condiciones de incubación.....	66
1.7.2.3.4	Identificación.....	66
1.7.2.4	Técnicas moleculares	67
1.8	Diagnóstico de la infección tuberculosa latente	69
1.8.1	Prueba cutánea de la tuberculina (TST).....	69
1.8.2	Ensayos de liberación de interferón- γ (IGRA)	70
1.9	Estudio de la sensibilidad del MTBC frente a los fármacos antituberculosos	71
1.9.1	Métodos fenotípicos	72
1.9.1.1	Métodos basados en medios de cultivo sólidos.....	73
1.9.1.2	Métodos basados en medios de cultivo líquidos	73
1.9.1.3	Métodos de sensibilidad alternativos	75
1.9.2	Métodos genotípicos.....	75
1.9.2.1	Mecanismos de resistencia	76
1.10	Tratamiento de la tuberculosis	76
1.10.1	Régimen estándar	77
1.10.2	Situaciones especiales	78
1.10.2.1	Pacientes pediátricos	78
1.10.2.2	Embarazo y lactancia	78
1.10.2.3	Hepatopatía crónica.....	79
1.10.2.4	Insuficiencia renal crónica	79
1.10.2.5	Formas extrapulmonares	79
1.10.2.6	Silicosis	79
1.10.2.7	Administración de corticoides.....	79
1.10.2.8	Administración de piridoxina.....	79
1.10.2.9	Coinfección por el VIH.....	79
1.10.2.10	Resistencia, alergia, intolerancia, toxicidad o interacciones	80
1.10.3	Control del tratamiento	81
1.10.4	Tratamiento preventivo de la infección tuberculosa	82
1.11	Investigación de casos relacionados con transmisión de TB.....	82
1.11.1	Epidemiología clásica.....	82
1.11.2	Epidemiología molecular.....	83

1.11.2.1	Análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción de la secuencia de inserción IS6110 (RFLP-IS6110).....	84
1.11.2.2	Tipificación mediante oligonucleótidos complementarios de secuencias espaciadoras: <i>spoligotyping</i> (<i>spacer oligo typing</i>)	85
1.11.2.3	Unidades repetitivas intercaladas micobacterianas - repeticiones en tándem de número variable: MIRU-VNTR. 85	
1.11.2.4	Secuenciación del genoma completo (WGS).....	86
2	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	89
2.1	Objetivo general.....	91
2.2	Objetivos específicos	91
3	METODOLOGÍA.....	93
3.1	Diseño y ámbito del estudio	95
3.2	Definición de las variables	98
3.2.1	Variables demográficas	98
3.2.2	Variables epidemiológicas.....	98
3.2.3	Variables microbiológicas	99
3.2.4	Variables clínicas.....	100
3.2.5	Variables temporales	102
3.3	Definiciones	103
3.3.1	Tipos de resistencia a los antituberculosos	103
3.4	Mantenimiento y recuperación de los aislados.....	104
3.5	Identificación fenotípica de los aislados	104
3.6	Identificación del complejo MTB	104
3.7	Extracción y purificación del ADN.....	104
3.7.1	Extracción y purificación del ADN para secuenciación	105
3.8	Cuantificación del ADN.....	105
3.9	Diferenciación de especies dentro del MTBC.....	105
3.10	Estudios de sensibilidad frente a fármacos antituberculosos.....	106
3.10.1	Estudios de sensibilidad fenotípica.....	106
3.10.2	Estudios de sensibilidad genotípica	108
3.10.2.1	GenoType MTBDR <i>plus</i>	108
3.10.2.2	Secuenciación de genoma completo (WGS).....	111

3.11	MIRU-VNTR	112
3.11.1	Procedimiento	112
3.11.2	Interpretación y análisis	114
3.11.3	MIRU-VNTR de 15 <i>loci</i> y comparación respecto al de 24 <i>loci</i>	115
3.12	Tipado de SNP para la asignación de linajes y sub-linajes	116
3.12.1	<i>High Resolution Melting</i> (HRM)	116
3.12.1.1	Procedimiento	117
3.12.1.2	Análisis de las curvas de fusión	120
3.12.2	Secuenciación de genoma completo (WGS)	123
3.12.3	Comparación del tipado de SNP respecto a la técnica MIRU-VNTR	123
3.12.4	Análisis de variables en función de los linajes encontrados	123
3.13	Secuenciación de genoma completo (WGS)	124
3.13.1	Procedimiento	124
3.13.2	Análisis bioinformático	124
3.13.3	Epidemiología molecular	125
3.13.4	Asignación de linajes y sub-linajes	125
3.13.5	Predicción de la sensibilidad frente a los antituberculosos	126
3.13.6	Comparación del poder discriminatorio de la WGS respecto a MIRU-VNTR	126
3.14	Análisis estadístico	126
3.15	Aceptación por la Comisión de Investigación y el Comité Ético de Investigación Clínica	127
3.16	Financiación	127
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	129
4.1	Aislados estudiados	131
4.2	Descripción de la muestra de pacientes origen de las cepas estudiadas	132
4.2.1	Datos demográficos	132
4.2.1.1	Género y grupos de edad	132
4.2.1.2	País de origen	135
4.2.2	Datos epidemiológicos	137
4.2.2.1	Tipo de caso: autóctono o importado	137
4.2.2.2	Antecedentes de contacto	139
4.2.3	Datos microbiológicos	139

4.2.3.1	Año de aislamiento.....	139
4.2.3.2	Procedencia de las peticiones.....	140
4.2.3.3	Tipos de muestras.....	141
4.2.4	Datos clínicos	143
4.2.4.1	Diagnóstico clínico	143
4.2.4.2	Casos bacilíferos	146
4.2.4.3	Coinfección por VIH.....	148
4.2.4.4	Presencia de sintomatología	151
4.2.4.5	Situación evolutiva de los pacientes.....	152
4.2.4.6	Antecedentes y comorbilidades.....	154
4.2.4.7	Ingreso hospitalario.....	154
4.2.4.8	Evolución de los pacientes tras el diagnóstico	157
4.2.5	Datos temporales relacionados con la TB: asistencia sanitaria, diagnóstico y tratamiento.....	158
4.3	Identificación fenotípica de los aislados	159
4.4	Identificación del MTBC mediante inmunocromatografía	159
4.5	Diferenciación de especies dentro del MTBC.....	160
4.6	Estudios de sensibilidad frente a fármacos antituberculosos.....	161
4.6.1	Estudios de sensibilidad fenotípica.....	161
4.6.2	Estudios de sensibilidad genotípica	162
4.6.2.1	GenoType MTBDR <i>plus</i>	162
4.6.2.2	Secuenciación de genoma completo (WGS).....	165
4.7	MIRU-VNTR	172
4.7.1	Estandarización de la tipificación MIRU-VNTR de 24 <i>loci</i>	172
4.7.2	Tipificación mediante MIRU-VNTR 24 <i>loci</i>	174
4.7.2.1	Frecuencia y diversidad alélica	187
4.7.2.2	Determinación de patrones agrupados y únicos	187
4.7.2.3	Estadística de los casos agrupados y únicos.....	207
4.7.2.4	Variabilidad del genotipado en función del tiempo	209
4.7.2.5	Discrepancia en la sensibilidad a fármacos en un mismo CC	210
4.7.3	Tipificación mediante MIRU-VNTR 15 <i>loci</i>	210
4.7.3.1	Determinación de patrones agrupados y únicos	210
4.7.4	Comparación de MIRU-VNTR 15 <i>loci</i> respecto 24 <i>loci</i>	213
4.8	Clasificación en linajes y sub-linajes	214
4.8.1	Asignación de linajes mediante MIRU-VNTR de 24 <i>loci</i>	214

Índice

4.8.2	Asignación de linajes mediante tipado de SNP	220
4.8.3	Evaluación de la asignación de linajes mediante MIRU-VNTR respecto al tipado de SNP	222
4.8.4	Frecuencia de los linajes en las cepas estudiadas	226
4.8.5	Distribución de los linajes en relación con las variables demográficas edad y género	227
4.8.6	Distribución geográfica de los linajes estudiados	228
4.8.7	Linajes del MTBC y presentación de la enfermedad	232
4.9	Secuenciación de genoma completo (WGS)	234
4.9.1	Tipificación mediante WGS	234
4.9.1.1	Determinación de patrones agrupados y únicos	234
4.9.1.2	Estadística de los casos agrupados y únicos	240
4.9.2	Comparación respecto MIRU-VNTR de 24 <i>loci</i>	242
4.9.2.1	Poder discriminatorio de las técnicas MIRU-VNTR y WGS	248
4.9.2.2	Comparación de la variación de SNP respecto a la variación de <i>loci</i>	249
4.10	Limitaciones del estudio	252
5	CONCLUSIONES	253
6	BIBLIOGRAFÍA	257
7	APÉNDICE DOCUMENTAL	281
	Apéndice I: Mecanismos de acción de los principales fármacos antituberculosos y genes implicados en la resistencia a éstos	281
	Apéndice II: Resultados obtenidos con el ensayo GenoType MTBC	285
	Apéndice III: Resultados de sensibilidad fenotípica de las 155 cepas	287
	Apéndice IV: Resultados de la sensibilidad genotípica obtenidos mediante GenoType MTBDR <i>plus</i> v.2.0. de las 49 cepas estudiadas y comparación con el método fenotípico	289
	Apéndice V: Resultados de la sensibilidad genotípica (WGS y GenoType) y fenotípica de 55 cepas	291
	Apéndice VI: Tabla alélica MIRU-VNTR 24 <i>loci</i> descrita por Supply <i>et al.</i> (175)	293
	Apéndice VII: Cepas estudiadas mediante MIRU-VNTR 24 <i>loci</i>	295
	Apéndice VIII: Cepas estudiadas mediante MIRU-VNTR 24 <i>loci</i>	297

Apéndice IX: Nomenclatura MLVA MtbC15-9 de los genotipos MIRU-VNTR estudiados 299

Apéndice X: Frecuencia alélica de cada uno de los 24 *loci* en las 155 cepas estudiadas 301

Apéndice XI: Asignación de linajes en función de la metodología empleada..... 303

Apéndice XII: Comparación WGS respecto a MIRU-VNTR 24 *loci*..... 307

Índice

LISTADO DE ABREVIATURAS

AAR	Ácido-alcohol resistencia
ACP	Acil portador de proteínas
ADA	Adenosina desaminasa
AMK	Amikacina
ATP	Adenosina trifosfato
BAAR	Bacilo ácido-alcohol resistente
BAL	Lavado bronco-alveolar
BAS	Aspirado bronquial
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CA	Consultorio Auxiliar
CAS	<i>Central Asian</i>
CC	Complejo clonal
CHGUV	Consorcio Hospital General Universitario de Valencia
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CPR	Capreomicina
CS	Centro de Salud
CTAB	Bromuro de N,N,N-trimetil,1-Hexadecan-amino o bromuro de cetiltrimetilamonio
CV	Comunitat Valenciana
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Departamento de Salud
DR	<i>Direct Repeat</i> (Repetición Directa)
E	Especificidad
EAI	<i>East Africa India</i>
ECDC	Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades
EEE	Espacio Económico Europeo
EMB	Etambutol

Listado de abreviaturas

EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
ETH	Etionamida
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FQ	Fluoroquinolonas
HC	Historia Clínica
HGDI	<i>Hunter Gaston Discriminatory Index</i> (Índice discriminatorio de Hunter-Gaston)
HRM	<i>High Resolution Melting</i> o análisis de alta resolución de fusión
IC	Intervalo de confianza
IFN- γ	Interferón- γ
IGRA	Ensayos de liberación de interferón- γ
IL	Interleucina
IP	Inhibidor de la proteasa
IS	Secuencia de inserción
ITL	Infección tuberculosa latente
INH	Isoniazida
KAN	Kanamicina
L	Linaje
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LSP	<i>Large Sequence Polymorphism</i> (Polimorfismo de secuencia larga)
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
MDR	<i>Multidrug Resistant</i> (Multirresistente)
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MGIT	<i>Mycobacterial Growth Indicator Tube</i>
MIRU	<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Units</i> (Unidades Repetitivas Intercaladas Micobacterianas)
MLRA	<i>Most Likely Recent Ancestor</i> (el antepasado reciente más probable)
MNT	Micobacterias no tuberculosas
MODS	<i>Microscopic-observation drug-susceptibility</i>

MR	Multirresistente
MST	<i>Minimum Spanning Tree</i> (Árbol de mínima expansión)
MT	Tipo mutante
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBC	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MUT	Mutación
NALC	N-acetil-L-cisteína
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NJ	<i>Neighbor-joining</i>
ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAAF	Punción aspiración con aguja fina
PAB	Antígeno proteico B
PAS	Ácido paraaminosalicílico
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
POA	Ácido pirazinoico
PPD	Derivado proteico purificado
PZA	Pirazinamida
qPCR	PCR cuantitativa
R	Resistente
RD	Región diferenciada (<i>Regions of difference</i>)
REMA	<i>Resazurin microtiter assay</i>
RENAVE	Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica
RMP	Rifampicina
RR	Resistente a rifampicina
RRDR	Región determinante de resistencia a rifampicina
S	Sensible / Sensibilidad
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SIL	Sistema Informático de Laboratorio

Listado de abreviaturas

SIP	Sistema de Información Poblacional
SIRI	Síndrome inflamatorio de reconstitución inmune
SM	Estreptomina
SDS	Dodecil sulfato sódico
SNC	Sistema nervioso central
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo de un único nucleótido)
STB	Bacilos tuberculosos lisos (<i>smooth tubercle bacilli</i>)
TAAN	Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos
TAR	Tratamiento antirretroviral
TB	Tuberculosis
TBE	Disolución tampón formada por Tris, borato y EDTA
Th	Linfocitos colaboradores (T <i>helpers</i>) o linfocitos T CD4 ⁺
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
T _m	Temperatura de fusión
TST	Prueba cutánea de la tuberculina (<i>Tuberculin Skin Test</i>)
UDVP	Usuarios/exusuarios de drogas por vía parenteral
UE	Unión Europea
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
UT	Unidades de tuberculina
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VNTR	<i>Variable Number Tandem Repeat</i> (repeticiones en tándem de número variable)
VPN	Valor predictivo negativo
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i> o Secuenciación de Genoma Completo
VPP	Valor predictivo positivo
WT	Tipo salvaje
XDR	<i>Extensively drug-resistant</i> (Ultrarresistente)
XR	Ultrarresistente

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Carga epidemiológica de TB estimada en 2017.	35
Tabla 2. Tinciones empleadas para el diagnóstico de micobacterias mediante microscopía.	63
Tabla 3. Clasificación de los fármacos antituberculosos a la hora de diseñar un esquema terapéutico contra la TB.	77
Tabla 4. Tratamientos de inicio de la TB.	78
Tabla 5. Esquemas básicos recomendados para los pacientes con mono/polirresistencia a isoniazida o rifampicina, TB MDR y TB XDR.	81
Tabla 6. Prioridades en el estudio de contactos.	83
Tabla 7. Cobertura poblacional del Departamento de Salud Valencia - Hospital General. Datos obtenidos del Sistema de Información Poblacional (SIP).	97
Tabla 8. Concentraciones críticas empleadas para el estudio de la sensibilidad a los fármacos antituberculosos de primera línea.	107
Tabla 9. Correlación entre las mutaciones en el gen <i>rpoB</i> y las bandas correspondientes tipo salvaje y mutación del ensayo GenoType® MTBDR <i>plus</i> versión 2.0.	110
Tabla 10. Correlación entre las mutaciones en el gen <i>katG</i> y las bandas correspondientes de tipo salvaje y de mutación. Ensayo GenoType® MTBDR <i>plus</i> versión 2.0.	110
Tabla 11. Correlación entre las mutaciones en la región del promotor del gen <i>inhA</i> y las bandas correspondientes de tipo salvaje y mutación. Ensayo GenoType® MTBDR <i>plus</i> versión 2.0.	111
Tabla 12. Volúmenes de reactivos empleados en la PCR para todos los <i>loci</i> , excepto 2059, 3690 y 4156.	112
Tabla 13. Volúmenes de reactivos empleados en la PCR para los <i>loci</i> 2059, 3690 y 4156.	113
Tabla 14. Condiciones de la PCR, descritas previamente por Supply <i>et al.</i> (175).	113
Tabla 15. Clases de SNP y cambios típicos de la temperatura de fusión (T _m).	117
Tabla 16. Volúmenes de reactivos empleados en la PCR múltiple para los linajes 2, 3 y 4 de MTBC mediante HRM.	118
Tabla 17. Volúmenes de reactivos empleados en la PCR dúplex para los linajes 1 y 6 de MTBC mediante HRM.	118

Listado de tablas

Tabla 18. Volúmenes de reactivos empleados en las PCR simples para el linaje 5 o <i>M. bovis</i> mediante HRM.....	118
Tabla 19. Volúmenes de reactivos empleados en la PCR dúplex para los sub-linajes 4.3 (LAM) y 4.10 (PGG3) mediante HRM.	119
Tabla 20. Volúmenes de reactivos empleados en las PCR simples para los sub-linajes 4.1.1 (X), 4.1.2 (Haarlem), 4.1.3 (Ghana), 4.2 (Ural), 4.4, 4.5, 4.6.1 (Uganda) y 4.6.2 (Cameroon) mediante HRM.	119
Tabla 21. Condiciones de la PCR para el tipado de linajes/sub-linajes del MTBC mediante HRM.	120
Tabla 22. Clasificación de la probabilidad de la transmisión en función de la diferencia de SNP.	125
Tabla 23. Pruebas estadísticas empleadas en el estudio en función del tipo de variables.	126
Tabla 24. Antecedente de contacto.	139
Tabla 25. Tipos de muestras clínicas a partir de las cuales se aislaron las cepas objeto de estudio.	142
Tabla 26. Diagnósticos clínicos de los pacientes origen de las cepas estudiadas.	144
Tabla 27. Evolución de los casos estudiados.	157
Tabla 28. Mutaciones asociadas a resistencia frente a INH y RMP obtenidas mediante GenoType MTBDR <i>plus</i> v.2.0.	164
Tabla 29. Mutaciones de resistencia encontradas <i>in silico</i> tras WGS y comparación respecto a GenoType MTBDR <i>plus</i> v.2.0.	166
Tabla 30. Comparación del estudio de sensibilidad genotípico mediante WGS respecto al fenotípico (técnica de referencia) para los antituberculosos de primera línea.	168
Tabla 31. Asignación alélica de la cepa de control H37Ra (ATCC 25177).	174
Tabla 32. Detección de complejos clonales mediante MIRU-VNTR 24 <i>loci</i> en las cepas estudiadas en función del umbral establecido: idéntico mirutipo (\neq 0), diferencia máxima de 1 <i>locus</i> (\neq 1) o diferencia máxima de 2 <i>loci</i> (\neq 2).	193
Tabla 33. Estadística de los casos agrupados y únicos. Genotipado por MIRU-VNTR 24 <i>loci</i> con una diferencia máxima de 2 <i>loci</i>	208
Tabla 34. Discrepancias observadas en la resistencia a los antituberculosos de primera línea entre cepas asignadas a un mismo CC, mediante MIRU-VNTR 24 <i>loci</i>	210

Tabla 35. Complejos clonales detectados mediante MIRU-VNTR de 15 <i>loci</i> y comparación respecto a 24 <i>loci</i> , empleando una diferencia máxima de 2 <i>loci</i> ($\neq 2$).	212
Tabla 36. Discrepancias en la asignación de linajes mediante NJ y UPGMA. Genotipado por MIRU-VNTR de 24 <i>loci</i>	218
Tabla 37. Frecuencia de los linajes en las cepas estudiadas asignados mediante tipado de SNP.	226
Tabla 38. Frecuencias absolutas de los linajes en función del diagnóstico de TB.	233
Tabla 39. Detección de complejos clonales mediante WGS del subgrupo de 55 cepas estudiadas.	234
Tabla 40. Estadística de los casos agrupados y únicos. Genotipado mediante WGS.	241
Tabla 41. Detección de complejos clonales mediante MIRU-VNTR 24 <i>loci</i> del subgrupo de 55 cepas estudiadas, en función del umbral establecido: idéntico mirutipo ($\neq 0$), diferencia máxima de 1 <i>locus</i> ($\neq 1$) o diferencia máxima de 2 <i>loci</i> ($\neq 2$).	245

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Principales causas de muerte en el mundo. Año 2016.	29
Figura 2. Incidencia estimada de TB en 2017 para países con al menos 100.000 casos incidentes.	31
Figura 3. Incidencia estimada de TB por países. Año 2017.	31
Figura 4. Incidencia de TB a nivel mundial por cada 100.000 habitantes y por año.	32
Figura 5. Prevalencia estimada de VIH en casos nuevos y recidivantes de TB. Año 2017.	32
Figura 6. Número estimado de muertes por VIH/SIDA y TB en 2017.	33
Figura 7. Estimaciones de la tasa de letalidad (CFR) por países, incluyendo las personas VIH negativas y positivas. Año 2017.	33
Figura 8. Mortalidad mundial debida a la TB (excluyendo personas VIH positivas) por cada 100.000 habitantes y por año.	34
Figura 9. Incidencia estimada de MDR/RR-TB para países con al menos 1.000 casos incidentes. Año 2017.	36
Figura 10. Porcentaje de casos nuevos de TB con MDR/RR-TB ^a por países.	37
Figura 11. Porcentaje de casos de TB tratados previamente con MDR/RR-TB TB ^a por países.	37
Figura 12. Países integrantes de la Región Europea de la OMS.	38
Figura 13. Tasas de notificación de nuevos casos de TB y recaídas por 100.000 habitantes en la Región Europea de la OMS. Año 2016.	39
Figura 14. Incidencia de TB por 100.000 habitantes por año. Región Europea de la OMS.	39
Figura 15. Incidencia de TB por 100.000 habitantes por año. UE/EEE.	40
Figura 16. Mortalidad por tuberculosis en los países de la UE/EEE. Año 2016.	41
Figura 17. Evolución de la mortalidad debida a la TB por 100.000 habitantes. Se excluyen los casos de TB coinfectados por el VIH. Región Europea de la OMS.	41
Figura 18. Porcentajes de MDR por países entre los casos nuevos de TB pulmonar confirmados por el laboratorio. Región Europea. Año 2016.	42
Figura 19. Porcentajes de MDR entre los casos de TB pulmonar confirmados por el laboratorio. Región Europea de la OMS.	43

Figura 20. Porcentajes de MDR entre casos de TB pulmonar confirmados por el laboratorio. UE/EEE.....	43
Figura 21. Porcentajes de MDR entre los casos de TB pulmonar confirmados por el laboratorio. Datos de los 18 países de la Región Europea de la OMS de alta prioridad.....	43
Figura 22. Tasas de notificación de TB por historial de tratamiento. Años 2007 - 2016.....	44
Figura 23. Tendencia en la tasa de notificación de TB por 100.000 habitantes entre los años 2012 y 2016 en países con menos de 20 casos por 100.000 habitantes en la Región Europea de la OMS.	45
Figura 24. Coinfección TB - VIH. Años 2007 - 2016.	45
Figura 25. Evolución de las tasas de TB en la CV. Años 2007 - 2017.....	46
Figura 26. Tasas de TB por Departamento de Salud de la CV. Año 2017. ...	47
Figura 27. Filogenia del genoma completo de 220 cepas de MTBC.....	50
Figura 28. Esquema simplificado que ilustra las relaciones filogenéticas de las cepas animales basadas en diferentes filogenias publicadas previamente.	51
Figura 29. Definición de los sub-linajes del linaje 4. Fuente: Stucki <i>et al.</i> (41).	52
Figura 30. Radiografía torácica que muestra un infiltrado cavitado en el lóbulo superior derecho en un paciente con tuberculosis activa.	60
Figura 31. Tinciones realizadas sobre una muestra directa positiva.....	62
Figura 32. Tinción de Ziehl-Neelsen realizada a partir de un MGIT positivo.	64
Figura 33. Organización territorial de los Departamentos de Salud de la Comunidad Valenciana. Localización geográfica del DS Valencia - Hospital General.	96
Figura 34. Distribución geográfica de las poblaciones incluidas en el DS Valencia - Hospital general.	96
Figura 35. Distribución geográfica de los Centros de Salud y Consultorios Auxiliares de la ciudad de Valencia incluidos en el DS Valencia - Hospital general.	97
Figura 36. Cronología asistencial de los casos de TB estudiados.....	103
Figura 37. Tabla de interpretación para el ensayo GenoType MTBC.	106
Figura 38. Regiones de resistencia del gen <i>rpoB</i> y las mutaciones más comunes que confieren resistencia a RMP detectadas por el ensayo GenoType® MTBDRplus versión 2.0.	109

Listado de figuras

Figura 39. Diagrama de la fluorescencia generada por cada muestra en función del tiempo durante un ensayo de HRM.	116
Figura 40. Gráfica de curvas de fusión obtenida mediante HRM.....	117
Figura 41. Curvas de fusión normalizadas.	121
Figura 42. Picos de fusión normalizados.	121
Figura 43. Mapa de calor (parte superior) y gráfica de diferencias (parte inferior).....	122
Figura 44. Diagrama de flujo de la selección de las cepas estudiadas.	131
Figura 45. Distribución por género de los pacientes.	132
Figura 46. Distribución por género en función del año de aislamiento.	133
Figura 47. Distribución por intervalos de edad de los pacientes.	134
Figura 48. Diagrama de cajas con la distribución de edades por género.	134
Figura 49. Distribución de edades en función del género.....	135
Figura 50. Diagrama de sectores con la distribución geográfica de los pacientes de origen no español.....	136
Figura 51. Diagrama de barras con la distribución por países de los pacientes de origen no español.....	136
Figura 52. Diagrama de cajas con la distribución de edad entre pacientes nacidos en España o en otros países.	137
Figura 53. Clasificación del caso en autóctono o importado.	138
Figura 54. Clasificación de los casos autóctonos en función del país de origen.	138
Figura 55. Representación cronológica basada en la fecha de obtención de las muestras de origen de las cepas estudiadas.	140
Figura 56. Distribución de las muestras de origen de las cepas estudiadas en función del año de obtención de éstas.	140
Figura 57. Diagrama de barras con la procedencia de las muestras de los aislados estudiados.	141
Figura 58. Origen de los tipos de muestras.....	142
Figura 59. Tipos de muestras clínicas agrupadas.	143
Figura 60. Diagnósticos clínicos agrupados de los pacientes origen de las cepas estudiadas.	143
Figura 61. Distribución de edades en función del diagnóstico clínico.	145
Figura 62. Distribución por género en función del diagnóstico clínico.	145

Figura 63. Pacientes con tuberculosis pulmonar o miliar con baciloscopia positiva.	146
Figura 64. Distribución de los enfermos bacilíferos en función de si los casos autóctonos proceden de España u otro país.	147
Figura 65. Distribución de edades entre enfermos bacilíferos y no bacilíferos.	147
Figura 66. Distribución por género de los enfermos bacilíferos y no bacilíferos.	148
Figura 67. Distribución de la coinfección por el VIH entre los pacientes origen de las cepas estudiadas.	149
Figura 68. Distribución de los pacientes coinfectados por VIH en función del género.	149
Figura 69. Distribución por edades en función de la coinfección VIH.	150
Figura 70. Distribución de los pacientes en función de la coinfección por el VIH y su país de origen.	150
Figura 71. Coinfección por el VIH y diagnóstico de TB.	151
Figura 72. Distribución de los pacientes en función de la sintomatología. .	152
Figura 73. Situación evolutiva de los pacientes en el momento del diagnóstico microbiológico.	152
Figura 74. Situación evolutiva de los pacientes en función del diagnóstico.	153
Figura 75. Situación evolutiva en función del origen de los casos autóctonos.	153
Figura 76. Distribución de los pacientes en función de los siguientes antecedentes o comorbilidades: enolismo, diabetes, neoplasias y UDVP. ..	154
Figura 77. Datos sobre el ingreso hospitalario de los casos estudiados.	155
Figura 78. Ingreso hospitalario en función del diagnóstico.	155
Figura 79. Tiempo de estancia hospitalaria en función del diagnóstico.	156
Figura 80. Tiempo de estancia hospitalaria en función de la coinfección por VIH.	156
Figura 81. Evolución de los casos en función del ingreso hospitalario.	158
Figura 82. Colonias de <i>M. tuberculosis</i> crecidas en medio de Löwenstein-Jensen.	159
Figura 83. Tinción de Ziehl-Neelsen positiva realizada desde colonia.	159
Figura 84. Técnica inmunocromatográfica BD MGIT TBc positiva.	160

Listado de figuras

Figura 85. Ejemplo de resultados obtenidos mediante el ensayo GenoType MTBC.....	161
Figura 86. Resultados de 10 de las 49 cepas estudiadas mediante GenoType MTBDRplus v.2.0.	163
Figura 87. Alineación de los codones de la proteína RpsA de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv, de la cepa DHM444 de <i>M. tuberculosis</i> resistente a PZA y <i>M. smegmatis</i>	171
Figura 88. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de 15 de los 24 <i>loci</i> estudiados en la cepa control H37Ra (ATCC 25177).....	172
Figura 89. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los restantes 9 <i>loci</i> estudiados en la cepa control H37Ra (ATCC 25177).....	173
Figura 90. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del <i>locus</i> 154 (MIRU 02).	175
Figura 91. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del <i>locus</i> 424 (VNTR 42 o Mtub 04).	175
Figura 92. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del <i>locus</i> 577 (VNTR 43 o ETRC).	176
Figura 93. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del <i>locus</i> 580 (MIRU 04).	176
Figura 94. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del <i>locus</i> 802 (MIRU 40).	177
Figura 95. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del <i>locus</i> 960 (MIRU 10).	177
Figura 96. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del <i>locus</i> 1644 (MIRU 16).	178
Figura 97. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del <i>locus</i> 1955 (1955 o Mtub 21).	178
Figura 98. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del <i>locus</i> 2059 (MIRU 20).	179
Figura 99. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del <i>locus</i> 2163 (QUB-11b o QUB2163b).	179
Figura 100. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del <i>locus</i> 2165 (ETRA).	180
Figura 101. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del <i>locus</i> 2347 (VNTR 46 o Mtub 29).....	180
Figura 102. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del <i>locus</i> 2401 (VNTR 47 o Mtub 30).....	181

Figura 103. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del <i>locus</i> 2461 (VNTR 48 o ETRB).	181
Figura 104. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del <i>locus</i> 2531 (MIRU 23).	182
Figura 105. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del <i>locus</i> 2687 (MIRU 24).	182
Figura 106. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del <i>locus</i> 2996 (MIRU 26).	183
Figura 107. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del <i>locus</i> 3007 (MIRU 27 o QUB-5).	183
Figura 108. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del <i>locus</i> 3171 (VNTR 49 o Mtub 34).	184
Figura 109. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del <i>locus</i> 3192 (MIRU 31 o ETRE).	184
Figura 110. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del <i>locus</i> 3690 (VNTR 52 o Mtub 39).	185
Figura 111. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del <i>locus</i> 4052 (QUB-26).	185
Figura 112. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del <i>locus</i> 4156 (VNTR 53 o QUB4156).	186
Figura 113. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del <i>locus</i> 4348 (MIRU 39).	186
Figura 114. Diversidad alélica calculada por la plataforma <i>on-line</i> MIRU-VNTR <i>plus</i> , a partir de las 155 cepas analizadas.	187
Figura 115. Número de cepas presentes en cada complejo clonal. Asignación mediante MIRU-VNTR 24 <i>loci</i> , con una diferencia máxima de 2 <i>loci</i> .	188
Figura 116. Diagrama de barras con las frecuencias absolutas de las cepas agrupadas o no en función del umbral establecido a la hora de asignar los complejos clonales: idéntico mirutipo ($\neq 0$), diferencia máxima de 1 <i>locus</i> ($\neq 1$) o diferencia máxima de 2 <i>loci</i> ($\neq 2$). Tipificación mediante MIRU-VNTR 24 <i>loci</i> .	189
Figura 117. Árbol de mínima expansión construido a partir de los aislados estudiados mediante MIRU-VNTR 24 <i>loci</i> , con una diferencia máxima entre complejos clonales (CC) de 2 <i>loci</i> .	190
Figura 118. Árbol de mínima expansión construido a partir de los aislados estudiados mediante MIRU-VNTR 24 <i>loci</i> , con una diferencia máxima entre complejos clonales (CC) de 1 <i>locus</i> .	191

Listado de figuras

Figura 119. Árbol de mínima expansión construido a partir de los aislados estudiados mediante MIRU-VNTR 24 <i>loci</i> . Los complejos clonales (CC) descritos presentan el mismo mirutipo.	192
Figura 120. Disposición geográfica de los casos de tuberculosis del CC 1 en función del área de atención primaria de cada caso.....	194
Figura 121. Disposición geográfica de los casos de tuberculosis del CC 2 en función del área de atención primaria de cada caso.....	195
Figura 122. Disposición geográfica de los casos de tuberculosis del CC 3 en función del área de atención primaria de cada caso.....	196
Figura 123. Disposición geográfica de los casos de tuberculosis del CC 4 en función del área de atención primaria de cada caso.....	197
Figura 124. Disposición geográfica de los casos de tuberculosis del CC 5 en función del área de atención primaria de cada caso.....	198
Figura 125. Disposición geográfica de los casos de tuberculosis del CC 6 en función del área de atención primaria de cada caso.....	198
Figura 126. Disposición geográfica de los casos de tuberculosis del CC 7 en función del área de atención primaria de cada caso.....	199
Figura 127. Disposición geográfica de los casos de tuberculosis del CC 8 en función del área de atención primaria de cada caso.....	200
Figura 128. Disposición geográfica de los casos de tuberculosis del CC9 en función del área de atención primaria de cada caso.....	200
Figura 129. Disposición geográfica de los casos de tuberculosis del CC 12 en función del área de atención primaria de cada caso.....	201
Figura 130. Disposición geográfica de los casos de tuberculosis del CC 13 en función del área de atención primaria de cada caso.....	202
Figura 131. Disposición geográfica de los casos de tuberculosis del CC 15 en función del área de atención primaria de cada caso.....	203
Figura 132. Disposición geográfica de los casos de tuberculosis del CC 17 en función del área de atención primaria de cada caso.....	204
Figura 133. Disposición geográfica de los casos de tuberculosis del CC 21 en función del área de atención primaria de cada caso.....	205
Figura 134. Disposición geográfica de los casos de tuberculosis del CC 22 en función del área de atención primaria de cada caso.....	206
Figura 135. Diferencias entre las cepas de un mismo paciente en función del tiempo. Genotipado mediante MIRU-VNTR 24 <i>loci</i>	209

Figura 136. Árbol de mínima expansión construido a partir de los aislados estudiados mediante MIRU-VNTR 15 <i>loci</i> , con una diferencia máxima entre complejos clonales (CC) de 2 <i>loci</i>	211
Figura 137. Diagrama de barras con las frecuencias absolutas de las cepas agrupadas o no en función del umbral establecido a la hora de asignar los complejos clonales: idéntico mirutipo ($\neq 0$), diferencia máxima de 1 <i>locus</i> ($\neq 1$) o diferencia máxima de 2 <i>loci</i> ($\neq 2$).	213
Figura 138. Comparación del índice discriminatorio de Hunter-Gaston (HGDI) obtenido para cada una de las dos técnicas empleadas, teniendo en cuenta el umbral establecido a la hora de asignar los complejos clonales: idéntico mirutipo ($\neq 0$), diferencia máxima de 1 <i>locus</i> ($\neq 1$) o diferencia máxima de 2 <i>loci</i> ($\neq 2$).	214
Figura 139. Asignación de linajes mediante MIRU-VNTR 24 <i>loci</i> . Árbol filogenético radial obtenido mediante el método <i>Neighbor Joining</i> a partir de la plataforma MIRU-VNTR <i>plus</i> y modificado mediante la plataforma iTOL (184).	215
Figura 140. Asignación de linajes mediante MIRU-VNTR 24 <i>loci</i> . Árboles filogenéticos obtenidos mediante el método <i>Neighbor Joining</i> (A) y UPGMA (B) a partir de la plataforma MIRU-VNTR <i>plus</i> y modificado mediante la plataforma iTOL (184). Ambos árboles presentan las 155 cepas estudiadas y la colección de cepas de la base de datos de MIRU-VNTR <i>plus</i> , empleadas para la asignación de linajes de nuestras cepas. Enraizados en dos cepas de <i>M. canettii</i>	216
Figura 141. Asignación de linajes mediante MIRU-VNTR 24 <i>loci</i> . Árboles filogenéticos obtenidos mediante el método <i>Neighbor Joining</i> (A) y UPGMA (B) a partir de la plataforma MIRU-VNTR <i>plus</i> con las 155 cepas estudiadas.	216
Figura 142. Asignación de sub-linajes dentro del linaje 4 mediante MIRU-VNTR 24 <i>loci</i>	218
Figura 143. Asignación de sub-linajes dentro del linaje 4 mediante MIRU-VNTR 24 <i>loci</i>	219
Figura 144. Filogenia global de 1.601 aislados de MTBC.	220
Figura 145. Árbol filogenético radial obtenido a partir de los datos de WGS por el método <i>Neighbor Joining</i> . Incluye las 55 cepas secuenciadas.	221
Figura 146. Árbol filogenético radial obtenido por el método <i>Neighbor Joining</i> a partir de los datos del genotipado mediante MIRU-VNTR 24 <i>loci</i> . Incluye las 55 cepas secuenciadas.	223
Figura 147. Árbol filogenético radial obtenido por el método UPGMA a partir de los datos del genotipado mediante MIRU-VNTR 24 <i>loci</i> . Incluye las 55 cepas secuenciadas.	224

Listado de figuras

Figura 148. Árbol filogenético radial obtenido por el método <i>Neighbor Joining</i> a partir de los datos de genotipado mediante MIRU-VNTR 24 <i>loci</i> de las 154 cepas estudiadas.	225
Figura 149. Frecuencia relativa de los linajes en las cepas estudiadas asignados mediante tipado de SNP.	227
Figura 150. Distribución de los linajes en función de la edad de los casos.	227
Figura 151. Distribución de los linajes en función del género de los casos.	228
Figura 152. Distribución de los linajes de MTBC en función del país de origen de los pacientes.	229
Figura 153. Estudio del linaje de las cepas procedentes de pacientes nacidos fuera de España en función del tiempo de residencia en este país.	230
Figura 154. Distribución de los linajes en función del origen del paciente y la presencia o no de coinfección por el VIH.	231
Figura 155. Frecuencias relativas de los linajes en función del diagnóstico de TB.	232
Figura 156. Posible ruta de transmisión establecida mediante WGS para el CC 1.	235
Figura 157. Topologías de la transmisión inferidas mediante WGS para los CC del 2 al 7.	237
Figura 158. Hipótesis sobre la posible transmisión de las cepas del CC6, según los datos obtenidos mediante WGS.	239
Figura 159. Secuencia temporal del procesamiento de las muestras de los dos casos pertenecientes CC 7 obtenido por WGS.	240
Figura 160. Árbol de mínima expansión construido a partir de los aislados clínicos estudiados mediante MIRU-VNTR 24 <i>loci</i> (N = 55), con una diferencia máxima entre CC de 2 <i>loci</i>	243
Figura 161. Diagrama de barras con las frecuencias absolutas de las cepas agrupadas o no en función de la metodología empleada: WGS o MIRU-VNTR 24 <i>loci</i>	244
Figura 162. Cepas incluidas en el complejo clonal 1 tipado mediante MIRU-VNTR 24 <i>loci</i>	245
Figura 163. Comparación de los resultados obtenidos con la metodología WGS (variación de SNP) respecto a MIRU-VNTR-24 <i>loci</i> (variación de <i>loci</i>) para el CC1.	246
Figura 164. Cepas incluidas en el complejo clonal 2 tipado mediante MIRU-VNTR 24 <i>loci</i>	247

Figura 165. Cepas incluidas en el complejo clonal 3 tipado mediante MIRU-VNTR 24 *loci*. 247

Figura 166. Cepas incluidas en el complejo clonal 4 tipado mediante MIRU-VNTR 24 *loci*. 248

Figura 167. Comparación del índice discriminatorio de Hunter-Gaston (HGDI) obtenido para cada una de las dos técnicas empleadas WGS y MIRU-VNTR 24 *loci*. 249

Figura 168. Comparación de MIRU-VNTR 24 *loci* respecto a WGS. 250

Listado de figuras

1 INTRODUCCIÓN

Introducción

1.1 Contexto actual de la tuberculosis

La Tuberculosis (TB) es una de las diez principales causas de muerte en el mundo (Figura 1) y la primera debida a una enfermedad infecciosa, incluso por encima del VIH/SIDA (1). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó para el 2017 que casi una cuarta parte de la población mundial presentaba una infección tuberculosa latente. Para ese año, se estimó que 10 millones de personas padecieron la enfermedad y que 1,6 millones fallecieron por esta causa (1).

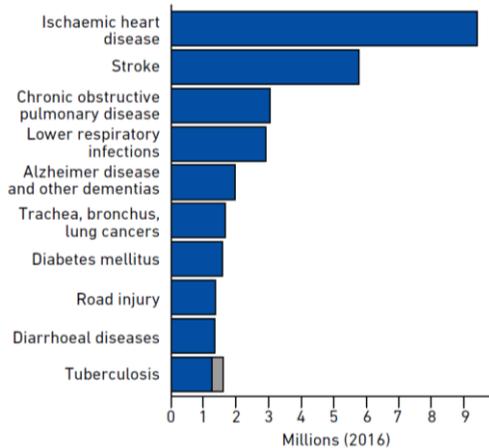


Figura 1. Principales causas de muerte en el mundo. Año 2016.

Las muertes por tuberculosis en personas coinfectadas por el VIH se muestran en gris.
Fuente: *Global Tuberculosis Report 2018*, WHO (1).

Se sabe que la TB es una enfermedad que ha ido evolucionando con la especie humana, existiendo pruebas de ella en restos arqueológicos neolíticos, precolombinos y egipcios (2,3). No obstante, la TB no se convirtió en un problema importante hasta la Revolución Industrial, cuando determinadas condiciones de vida como el hacinamiento favorecieron su transmisión. En Europa, la TB fue responsable de una cuarta parte de todas las muertes ocurridas en adultos durante los siglos XVII y XVIII, cuando todavía no se disponía de tratamiento. En 1946, con la demostración de la eficacia de la estreptomina, se inició la era moderna de esta enfermedad; a partir de este momento se fueron descubriendo fármacos activos frente a la TB, como la isoniazida en 1952 y la rifampicina en 1970, hasta llegar a los tratamientos actuales.

En 2014 se celebró la Asamblea Mundial de la Salud, donde se aprobó por unanimidad la Estrategia de la OMS para el final de la TB, en la que participaron todos los Estados Miembros de la OMS y las Naciones Unidas. Posteriormente, en 2015 también adoptaron los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de las Naciones Unidas. Los objetivos específicos

establecidos para esta estrategia fueron la reducción del número absoluto de muertes por TB en un 90% y la reducción de la incidencia de esta enfermedad en un 80% para el año 2030, respecto a los datos de 2015. Para ello, los Estados Miembros se comprometieron a adoptar la estrategia y ponerla en práctica, con un compromiso de alto nivel y aportando la financiación necesaria.

El 26 de septiembre de 2018 se celebró en Nueva York la Asamblea General de las Naciones Unidas, donde los Estados miembros celebraron la primera reunión de alto nivel sobre la TB. La reunión, alineada con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la ONU, dio lugar a una declaración política respaldada por los Jefes de Estado y de Gobierno que describía los compromisos clave que deben cumplirse para que el mundo acabe con la epidemia de TB antes de 2030. En 2023, los Estados miembros de la ONU se han comprometido a convocar una nueva reunión de alto nivel para dar seguimiento a la lucha contra esta enfermedad y realizar una revisión exhaustiva del progreso en este ámbito.

A continuación, se exponen datos sobre la epidemiología de la enfermedad a nivel mundial, europeo, nacional, de la Comunitat Valenciana y del Departamento de Salud Valencia-Hospital General.

1.1.1 Ámbito mundial

En el informe anual sobre la TB realizado por la OMS, publicado en 2018 con datos de 2017 (1), se estima que unos 10,0 millones de personas desarrollaron la enfermedad tuberculosa, con un 58% de hombres, un 32% de mujeres y un 10% de niños. En él se destaca que dos terceras partes de los casos se dieron en ocho países: India (27%), China (9%), Indonesia (8%), Filipinas (6%), Pakistán (5%), Nigeria (4%), Bangladesh (4%) y Sudáfrica (3%). Estos países, junto con otros veintidós, forman parte del listado de la OMS con los treinta países con alta carga de TB, los cuales supusieron el 87% de los casos en el mundo (Figura 2).

La gravedad de las epidemias nacionales varía ampliamente entre los países (Figura 3). En 2017, hubo menos de 10 casos nuevos por cada 100.000 habitantes en la mayoría de los países con ingresos altos, entre 150 y 400 en la mayoría de los 30 países con alta carga de TB, y más de 500 en unos pocos países, incluyendo Mozambique, Filipinas y Sudáfrica (1).

Según datos de OMS, está disminuyendo la carga de la enfermedad tuberculosa a nivel mundial, en todas las regiones de la OMS y en la mayoría de los países. No obstante, este descenso no es lo suficientemente rápido como para alcanzar los primeros hitos (2020) de la Estrategia para el final de la TB. En la Figura 4 se muestra la evolución de la incidencia mundial de esta enfermedad por 100.000 personas y año.



Figura 2. Incidencia estimada de TB en 2017 para países con al menos 100.000 casos incidentes.

Fuente: *Global Tuberculosis Report 2018*, WHO (1).

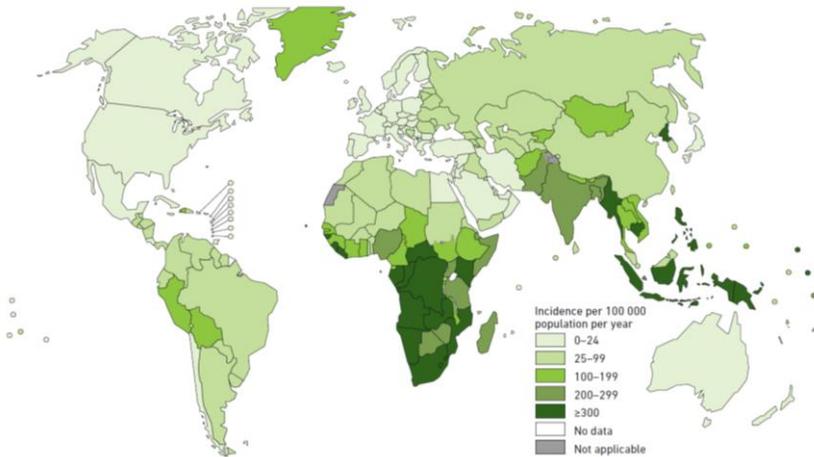


Figura 3. Incidencia estimada de TB por países. Año 2017.

Fuente: *Global Tuberculosis Report 2018*, WHO (1).

Introducción

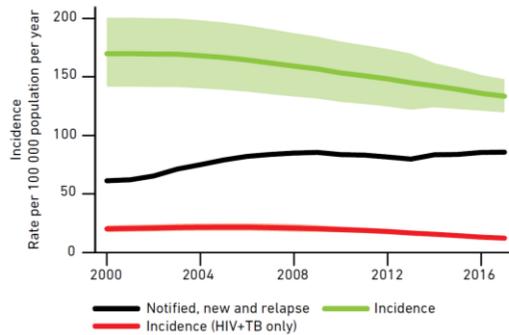


Figura 4. Incidencia de TB a nivel mundial por cada 100.000 habitantes y por año.
Fuente: *Global Tuberculosis Report 2018*, WHO (1).

En cuanto a las personas coinfectadas por el VIH, éstas representaron el 9% del total de casos nuevos de TB en 2017 (1). No obstante, en África esta cifra fue muy superior, situándose en el 72% de sus casos. La prevalencia de la coinfección por el VIH en los casos de TB por países se ilustra en la Figura 5.

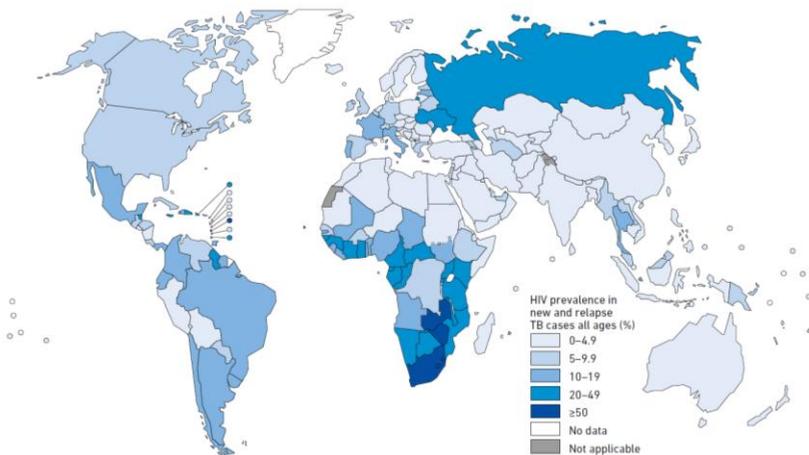


Figura 5. Prevalencia estimada de VIH en casos nuevos y recidivantes de TB. Año 2017.
Fuente: *Global Tuberculosis Report 2018*, WHO (1).

La mortalidad por TB en 2017 fue estimada por la OMS (1) en 1,3 millones de muertes entre personas VIH negativas y en 300.000 muertes adicionales por TB entre personas VIH positivas (Figura 6). Por países, la tasa de letalidad de la TB se muestra en la Figura 7.

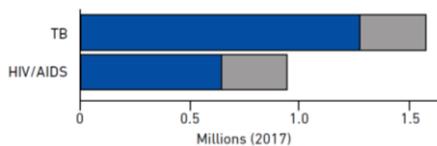


Figura 6. Número estimado de muertes por VIH/SIDA y TB en 2017. Las muertes por TB entre personas con VIH se muestran en gris.
 Fuente: *Global Tuberculosis Report 2018*, WHO (1).

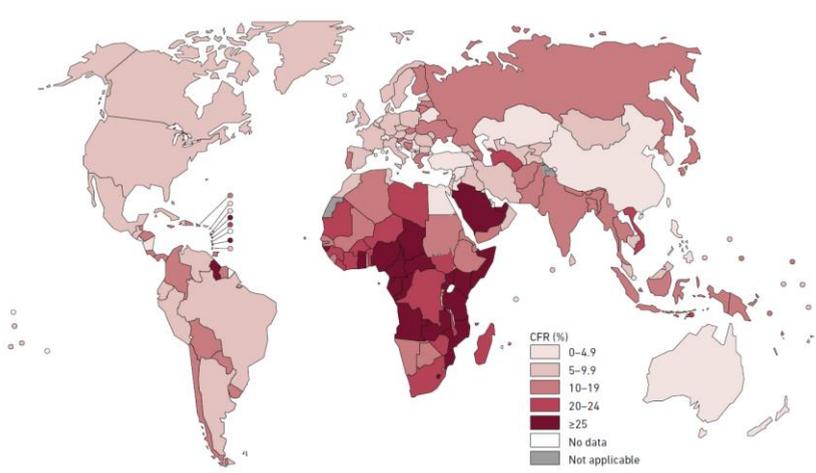


Figura 7. Estimaciones de la tasa de letalidad (CFR) por países, incluyendo las personas VIH negativas y positivas. Año 2017.
 Fuente: *Global Tuberculosis Report 2018*, WHO (1).

Globalmente, la mortalidad por TB en 2017 fue del 16%, en comparación con el 23% del año 2.000. La tasa de mortalidad por tuberculosis (muertes por tuberculosis por cada 100.000 habitantes por año) en personas VIH negativas está disminuyendo en torno al 3% por año (1), como se observa en la Figura 8. Por regiones, las disminuciones más rápidas en los últimos 5 años analizados (2013-2017) se produjeron en la Región de Europa de la OMS (11% por año) y en la Región de Asia Suroriental de la OMS (4% por año). Entre los países con alta carga de TB, los que presentaron tasas de disminución superiores al 6% por año en ese mismo periodo fueron la Federación de Rusia (13% por año), Etiopía (12% por año), Sierra Leona (10% por año), Kenia (8% por año) y Vietnam (8% por año).

Introducción

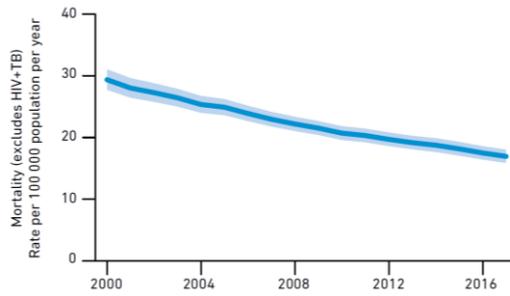


Figura 8. Mortalidad mundial debida a la TB (excluyendo personas VIH positivas) por cada 100.000 habitantes y por año.

Fuente: *Global Tuberculosis Report 2018*, WHO (1).

A modo de resumen, la Tabla 1 muestra los datos de 2017 estimados por la OMS sobre incidencia total de TB, mortalidad por esta enfermedad en pacientes en función de la coinfección por el VIH y la prevalencia del VIH entre los casos nuevos de TB.

Tabla 1. Carga epidemiológica de TB estimada en 2017.

Se muestran los datos de los 30 países con alta carga de TB, las regiones de la OMS y el global. Porcentaje por 100.000 habitantes. Fuente: *Global Tuberculosis Report 2018*, WHO (1).

	HIV-NEGATIVE TB MORTALITY		HIV-POSITIVE TB MORTALITY ^a		TOTAL TB INCIDENCE		HIV PREVALENCE IN INCIDENT TB (%)	
	BEST ESTIMATE	UNCERTAINTY INTERVAL	BEST ESTIMATE	UNCERTAINTY INTERVAL	BEST ESTIMATE	UNCERTAINTY INTERVAL	BEST ESTIMATE	UNCERTAINTY INTERVAL
Angola	67	39-103	26	13-44	359	232-512	17	10-25
Bangladesh	36	23-52	0.11	0.05-0.18	221	161-291	0.15	0.08-0.24
Brazil	2.4	2.3-2.5	0.91	0.67-1.2	44	37-50	12	11-13
Cambodia	19	13-27	2.6	1.7-3.6	326	224-447	2.5	2.3-2.7
Central African Republic	68	38-105	58	31-94	423	274-604	32	21-43
China	2.6	2.4-2.9	0.13	0.06-0.22	63	54-73	1.3	0.73-2.0
Congo	63	36-98	43	22-71	376	239-545	27	17-37
DPR Korea	63	43-86	0.17	0.09-0.28	513	446-584	0.13	0.07-0.21
DR Congo	60	35-90	9.2	4.3-16	322	208-460	7.6	4.4-12
Ethiopia	24	15-35	3.5	2.4-4.8	164	115-221	7.2	6.6-7.8
India ^b	31	28-33	0.79	0.48-1.2	204	140-281	3.1	2.8-3.5
Indonesia	40	38-43	3.6	1.9-5.8	319	291-348	4.3	2.4-6.7
Kenya	50	28-78	37	22-55	319	195-472	29	26-32
Lesotho	46	25-75	206	128-302	665	430-949	71	63-78
Liberia	57	34-86	19	12-28	308	199-440	15	13-17
Mozambique ^c	73	43-111	90	56-131	551	356-787	40	36-44
Myanmar ^c	51	33-73	9.2	6.6-12	358	263-466	8.7	8.0-9.4
Namibia ^c	30	19-43	31	22-43	423	324-535	36	35-38
Nigeria	63	36-96	18	11-27	219	143-311	14	12-16
Pakistan	27	21-34	1.1	0.56-1.9	267	189-357	1.4	0.78-2.2
Papua New Guinea	53	36-73	11	6.2-18	432	352-521	9.9	5.9-15
Philippines	25	22-29	0.36	<0.01-3.1	554	311-866	1.2	0.69-1.9
Russian Federation	7.3	6.6-8.0	1.2	0.59-1.9	60	39-85	21	20-23
Sierra Leone	39	23-59	10	6.5-15	301	193-431	12	12-13
South Africa ^c	39	35-43	99	68-135	567	406-754	60	55-64
Thailand	13	10-17	4.2	3.1-5.6	156	119-199	11	9.7-11
UR Tanzania	47	21-83	39	18-67	269	127-464	31	28-35
Viet Nam ^c	12	7.8-17	0.88	0.64-1.2	129	106-155	3.6	3.4-3.9
Zambia	30	17-45	76	48-110	361	234-514	58	53-64
Zimbabwe	12	7.7-17	38	27-51	221	164-287	63	59-67
High TB burden countries	23	22-25	5.2	4.5-5.9	183	161-206	8.8	7.4-10
Africa	39	33-46	24	21-27	237	211-263	27	23-31
The Americas	1.8	1.7-1.9	0.60	0.53-0.67	28	26-30	11	9.6-12
Eastern Mediterranean	13	11-15	0.43	0.26-0.66	113	90-139	1.3	0.73-2.0
Europe	2.6	2.5-2.7	0.54	0.41-0.69	30	26-34	12	9.1-16
South-East Asia	32	30-35	1.4	1.1-1.8	226	179-277	3.5	2.4-4.7
Western Pacific	4.9	4.5-5.3	0.26	0.20-0.34	94	78-112	1.8	1.2-2.4
GLOBAL	17	16-18	4.0	3.5-4.5	133	120-148	9.2	7.9-11

^a Las muertes entre los casos de TB VIH positivos se clasifican como muertes por VIH según la CIE-10.

^b Las estimaciones de la incidencia de TB y la mortalidad en la India son provisionales, y están pendientes de los resultados de la encuesta nacional de prevalencia de TB planificada para 2019/2020.

^c Las estimaciones de la incidencia y mortalidad de la tuberculosis en Mozambique, Myanmar, Namibia, Sudáfrica y Vietnam se revisarán después de que los resultados finales de sus respectivas encuestas nacionales de prevalencia de tuberculosis estén disponibles en 2019.

Introducción

Por lo que respecta a las resistencias frente a los fármacos antituberculosos, la OMS estima que 558.000 personas desarrollaron TB resistente a la rifampicina (RR) en 2017, de las cuales el 82% fueron multirresistente (MDR) (1). Destaca, que casi la mitad de estos casos MDR/RR se dieron en tres países (Figura 9): India (24%), China (13%) y la Federación Rusa (10%). A nivel mundial, el reparto de casos MDR/RR en casos nuevos y tratados previamente fue del 3,5% y del 18%, respectivamente. La Figura 10 y la Figura 11 muestran esos datos por países. Las proporciones más altas (más del 50% en casos tratados previamente) se encuentran en países de la antigua Unión Soviética. Entre los casos de MDR la OMS estimó que el 8,5% tenía una TB extremadamente resistente (XDR).



Figura 9. Incidencia estimada de MDR/RR-TB para países con al menos 1.000 casos incidentes. Año 2017.

Fuente: *Global Tuberculosis Report 2018*, WHO (1).

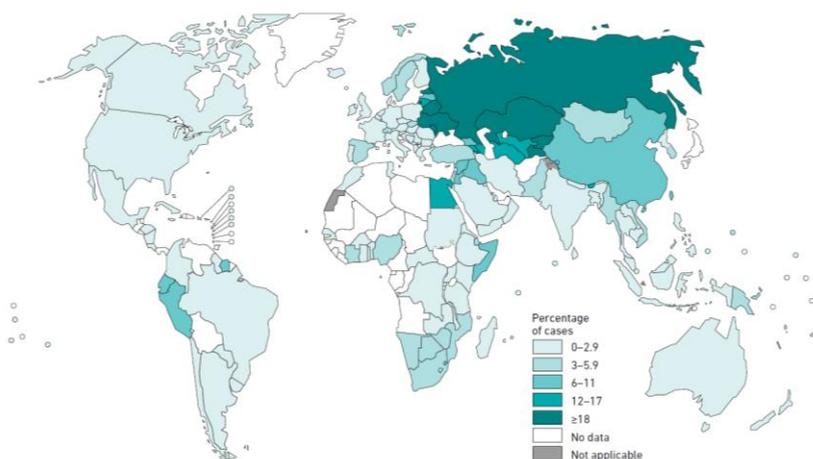


Figura 10. Porcentaje de casos nuevos de TB con MDR/RR-TB^a por países.

^a Las cifras se basan en el año más reciente para el que se han notificado datos, que varía según los países. Los datos cubren el período 2002-2018. Fuente: *Global Tuberculosis Report 2018*, WHO (1).

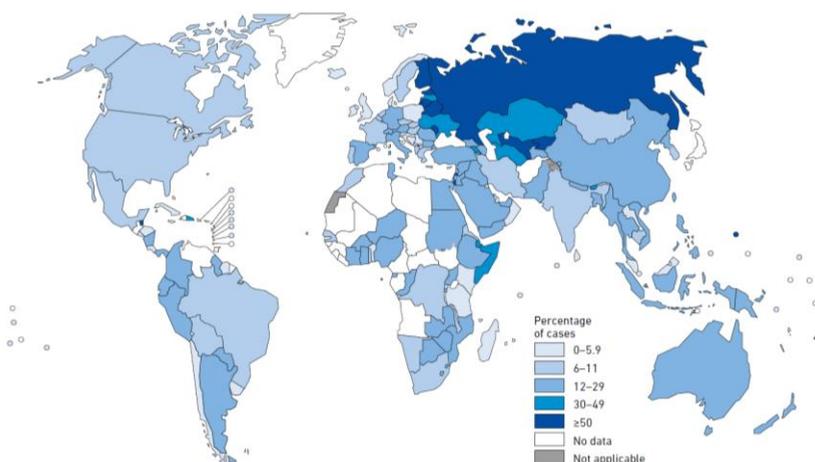


Figura 11. Porcentaje de casos de TB tratados previamente con MDR/RR-TB TB^a por países.

^a Las cifras se basan en el año más reciente para el que se han notificado datos, que varía según los países. Los datos cubren el período 2005-2018. Los altos porcentajes de casos de TB tratados previamente con RR-TB en Belice, Guam y Santo Tomé y Príncipe se refieren solo a un pequeño número de casos notificados (rango: 1-8 casos de TB notificados previamente tratados). Fuente: *Global Tuberculosis Report 2018*, WHO (1).

Otro aspecto importante a reseñar según la OMS (1), es que se estima que aproximadamente 1.700 millones de personas tienen una infección latente de TB, lo que supone el 23% de la población mundial. Por tanto, casi una cuarta

parte de la población corre el riesgo de desarrollar una TB activa durante su vida.

1.1.2 *Ámbito europeo*

La vigilancia de la tuberculosis en los países de la Unión Europea (UE) y del Espacio Económico Europeo¹ (EEE) corresponde al ECDC (Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades) en coordinación con la Oficina Regional Europea de la OMS, la cual recoge los datos del resto de los países, con un total de 53 (Figura 12). Ambos organismos elaboran un informe anual sobre la TB en Europa. Los datos oficiales más recientes corresponden al Informe de vigilancia y seguimiento de la Tuberculosis en Europa de 2018 con cifras recogidas hasta el año 2016 (4). A continuación, se resumen los datos más importantes de este informe.



Figura 12. Países integrantes de la Región Europea de la OMS.

Fuente: <https://www.who.int/about/regions/euro/es/> (consultado el 20/01/19).

En 2016, se notificaron 58.994 casos de tuberculosis en los 30 países de la UE/EEE, mientras que en el resto de los países de la Región Europea de la OMS fueron 238.138 casos, suponiendo un total de 297.132. El 84,7% de estos se dieron en 18 países, considerados de alta prioridad² por este organismo. Por países, la tasa de notificación de casos nuevos y recaídas varía ampliamente, desde ninguno en San Marino hasta 118 por 100.000 habitantes en Kirguistán (Figura 13).

¹Los países miembros de la Unión Europea y del Espacio Económico Europeo se muestran en el siguiente enlace, consultado el 20/01/2019: <http://www.interior.gob.es/web/servicios-al-ciudadano/extranjeria/control-de-fronteras/estados-del-espacio-economico-europeo-eee->

²Los 18 países de mayor prioridad dentro de la Región Europea de la OMS son: Armenia, Azerbaiyán, Bielorrusia, Bulgaria, Estonia, Georgia, Kazajistán, Kirguistán, Letonia, Lituania, Moldavia, Rumania, Rusia, Tayikistán, Turquía, Turkmenistán, Ucrania y Uzbekistán.

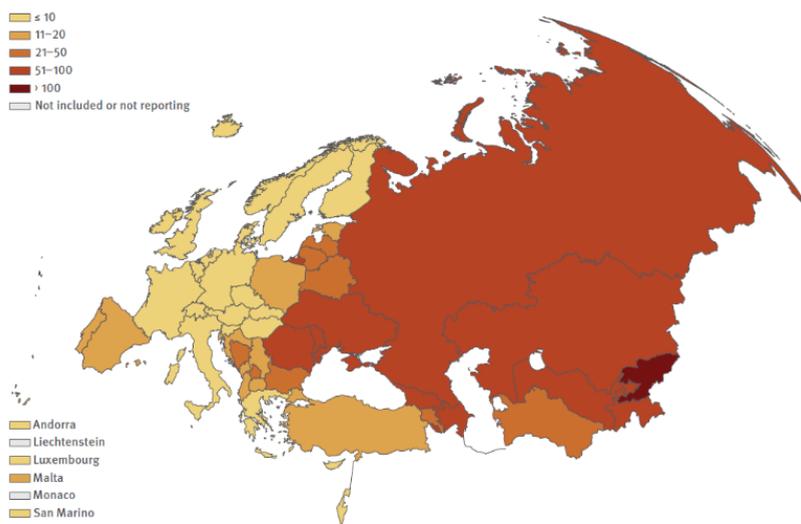


Figura 13. Tasas de notificación de nuevos casos de TB y recaídas por 100.000 habitantes en la Región Europea de la OMS. Año 2016.

Fuente: Informe de vigilancia y seguimiento de la Tuberculosis en Europa de 2018, datos de 2016 (4).

En los últimos 10 años, la incidencia de TB en la Región ha disminuido de 47 a 32 casos por 100.000 habitantes (Figura 14). Si se consideran únicamente los países de la UE/EEE, la incidencia de TB se ha reducido de 23 a 12 casos por 100.000 habitantes en los últimos veintiún años analizados (Figura 15).

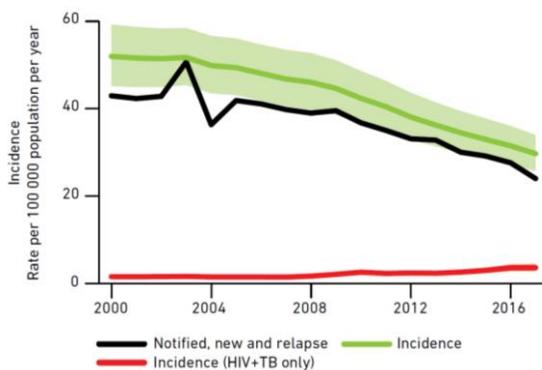


Figura 14. Incidencia de TB por 100.000 habitantes por año. Región Europea de la OMS. Fuente: *Global Tuberculosis Report 2018*, WHO (1).

Introducción

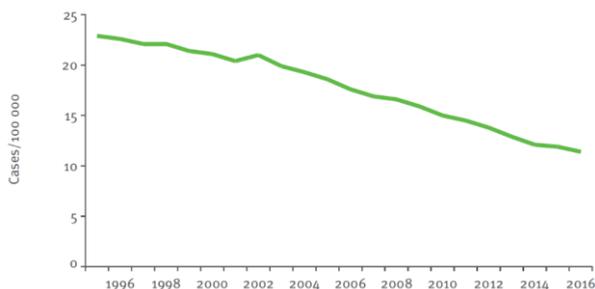


Figura 15. Incidencia de TB por 100.000 habitantes por año. UE/EEE.
Faltan los datos de Liechtenstein (excepto 2007). Fuente: Informe de vigilancia y seguimiento de la Tuberculosis en Europa de 2018, datos de 2016 (4).

La proporción de casos incidentes de TB coinfectados por el VIH fue del 5,9% en los países de la UE/EEE y del 13,1% para el resto (12% global). No obstante, en el informe se indica que todavía existe una importante carencia de datos sobre coinfección. Durante el período 2007-2016, en la Región de Europa de la OMS se ha producido un aumento sin precedentes en la prevalencia del VIH en casos incidentes de TB del 3% al 12%.

La mortalidad estimada por TB para 2016 en la UE/EEE fue de 0,8 muertes por 100.000 habitantes. La OMS ha establecido un objetivo regional de menos de 2,7 muertes por 100.000 habitantes, alcanzado por todos los Estados miembros de la UE/EEE, excepto Lituania y Rumania (Figura 16). En cuanto al resto de los países de la Región Europea de la OMS, la mortalidad estimada fue de 5,5 muertes por 100.000 habitantes. Globalmente, se situó en 2,8 muertes por 100.000 habitantes, lo que supuso 26.000 muertes por TB en esta Región durante el año 2016.

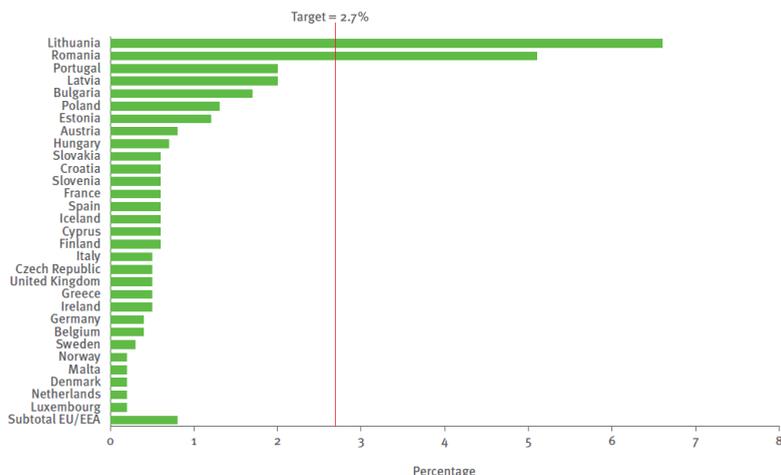


Figura 16. Mortalidad por tuberculosis en los países de la UE/EEE. Año 2016.
Fuente: Informe de vigilancia y seguimiento de la Tuberculosis en Europa de 2018, datos de 2016 (4).

En la Figura 17, se muestra la evolución de la mortalidad por TB en la Región Europea, donde se puede observar como a partir de 2006 comienza a disminuir linealmente la mortalidad, desde 6,5 a 2,8 muertes por 100.000 habitantes, para los años 2007 y 2016, respectivamente.

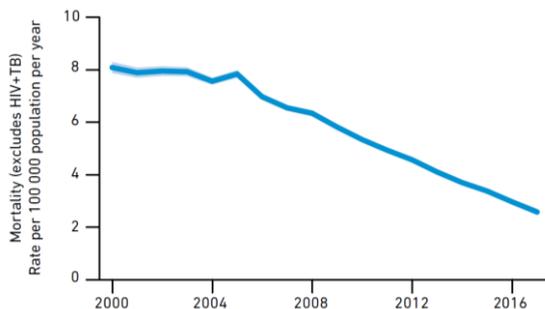


Figura 17. Evolución de la mortalidad debida a la TB por 100.000 habitantes. Se excluyen los casos de TB coinfectados por el VIH. Región Europea de la OMS.
Fuente: Global Tuberculosis Report 2018, WHO (1).

Por lo que respecta a la TB MDR, en la UE/EEE se notificó en el 3,7% de los 36.071 casos que disponían de resultados sobre las pruebas de sensibilidad a los fármacos antituberculosos de primera línea. Cabe destacar, que en los tres países bálticos este porcentaje superó el 10% (Figura 18). Por otro lado, la TB XDR se notificó en el 20,1% de los 984 casos de TB MDR para los que se disponían datos de la sensibilidad a los fármacos antituberculosos de segunda línea.

Introducción

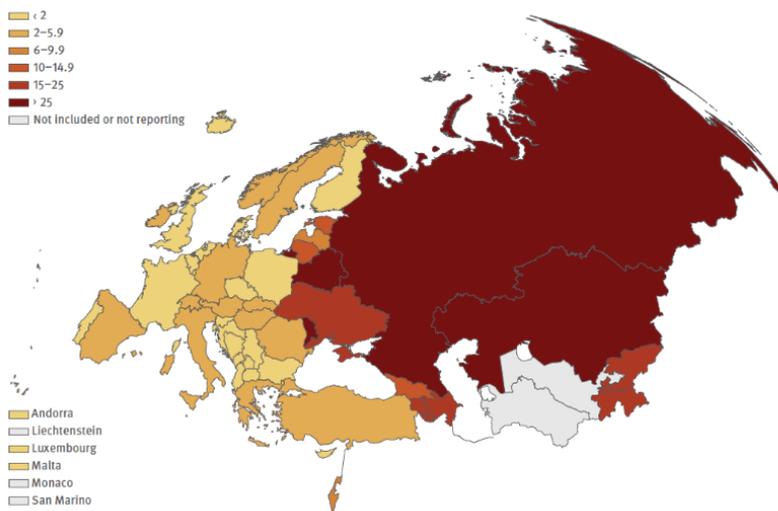


Figura 18. Porcentajes de MDR por países entre los casos nuevos de TB pulmonar confirmados por el laboratorio. Región Europea. Año 2016.

Fuente: Informe de vigilancia y seguimiento de la Tuberculosis en Europa de 2018, datos de 2016 (4).

Si se tienen en cuenta todos los países que integran la Región Europea de la OMS, en 2016, surgieron aproximadamente 71.000 casos incidentes de tuberculosis RR/MDR. Esto representa aproximadamente el 20% de la carga global RR/MDR, que es de 350.000 casos. Este hecho se debe a que esta Región incluye nueve de los 30 países con la mayor carga de TB MDR en el mundo³ (Figura 18). La proporción de tuberculosis RR/MDR entre los casos nuevos y tratados previamente en la Región también está significativamente por encima del promedio mundial, con un 19% en casos nuevos y un 55% en los casos tratados previamente (Figura 19), en comparación con el 4,1% y el 19% respectivamente.

La evolución durante los años 2012 – 2016 de la MDR entre los casos de TB pulmonar confirmados por el laboratorio para la Región Europea de la OMS, la UE/EEE y los 18 países de alta prioridad se muestran en la Figura 19, Figura 20 y Figura 21, respectivamente.

³Los nueve países de la Región Europea de la OMS con la mayor carga de TB MDR son: Azerbaiyán, Bielorrusia, Kazajistán, Kirguistán, Moldavia, Rusia, Tayikistán, Ucrania y Uzbekistán.

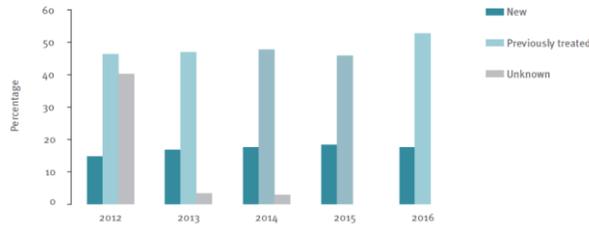


Figura 19. Porcentajes de MDR entre los casos de TB pulmonar confirmados por el laboratorio. Región Europea de la OMS.

Fuente: Informe de vigilancia y seguimiento de la Tuberculosis en Europa de 2018, datos de 2016 (4).



Figura 20. Porcentajes de MDR entre casos de TB pulmonar confirmados por el laboratorio. UE/EEE.

Fuente: Informe de vigilancia y seguimiento de la Tuberculosis en Europa de 2018, datos de 2016 (4).

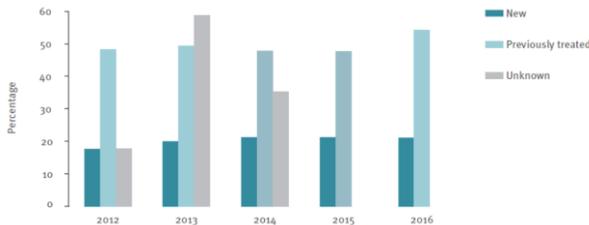


Figura 21. Porcentajes de MDR entre los casos de TB pulmonar confirmados por el laboratorio. Datos de los 18 países de la Región Europea de la OMS de alta prioridad.

Fuente: Informe de vigilancia y seguimiento de la Tuberculosis en Europa de 2018, datos de 2016 (4).

1.1.3 *Ámbito nacional*

A nivel nacional, el Centro Nacional de Epidemiología a través de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) recoge todas las notificaciones de TB enviadas por las autoridades de salud pública de las Comunidades Autónomas, puesto que se trata de una enfermedad de declaración obligatoria. Además, es el encargado de transmitir la información al ECDC y a la OMS, así como de elaborar los informes nacionales anuales.

Introducción

No obstante, dado que el último informe nacional publicado sobre TB es del 2014⁴ (5), utilizaremos los datos publicados por el ECDC (4) y la OMS (1).

Para España, la OMS (1) estimó una incidencia de TB de 10 casos por 100.000 habitantes para el año 2017, lo que supuso unos 4.600 casos. De esos casos incidentes, 340 pertenecieron a pacientes coinfectados por el VIH (7,4%). La evolución de la incidencia de la TB en España se muestra en la Figura 22, donde se observa cómo va disminuyendo paulatinamente desde unos 17 casos por 100.000 habitantes en 2008 a los 10 casos por 100.000 habitantes en 2017 (datos de 2017 no mostrados en la gráfica). Respecto a los países de la Región Europea de la OMS con una incidencia inferior a los 20 casos por 100.000 habitantes, España se posiciona en el vigésimo quinto lugar (Figura 23), según datos de 2016 (4). Por otra parte, el evolutivo de la coinfección TB - VIH se ilustra en la Figura 24. Cabe resaltar que en 2016 todavía existía un 40% de casos de TB donde la información sobre la infección por el VIH era desconocida.

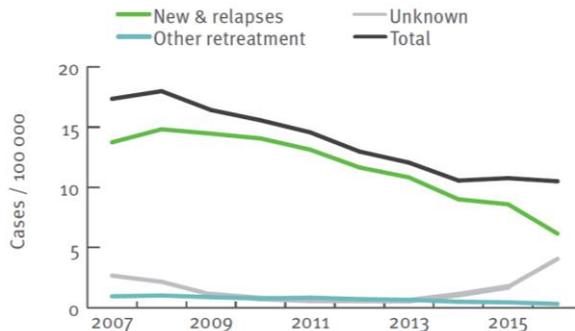


Figura 22. Tasas de notificación de TB por historial de tratamiento. Años 2007 - 2016.
Fuente: Informe de vigilancia y seguimiento de la Tuberculosis en Europa de 2018, datos de 2016 (4).

La mortalidad por TB estimada por la OMS (1) para el 2017 estuvo en 0,65 muertes por 100.000 habitantes independientemente de la coinfección por el VIH (Figura 16), suponiendo un total de 300 muertes. De éstas, 250 muertes pertenecieron a pacientes VIH negativos y 50 a pacientes VIH positivos.

En cuanto a la TB RR/MDR, la incidencia fue de 0,58 casos por 100.000 habitantes en 2017 (1), lo que se tradujo en 270 casos. El porcentaje medido de casos de TB con RR/MDR en el año 2015 fue del 4,2% para los nuevos casos y del 18% en los casos tratados previamente (1).

⁴Fuente consultada el 21/01/2019: <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/tuberculosis.shtml>.

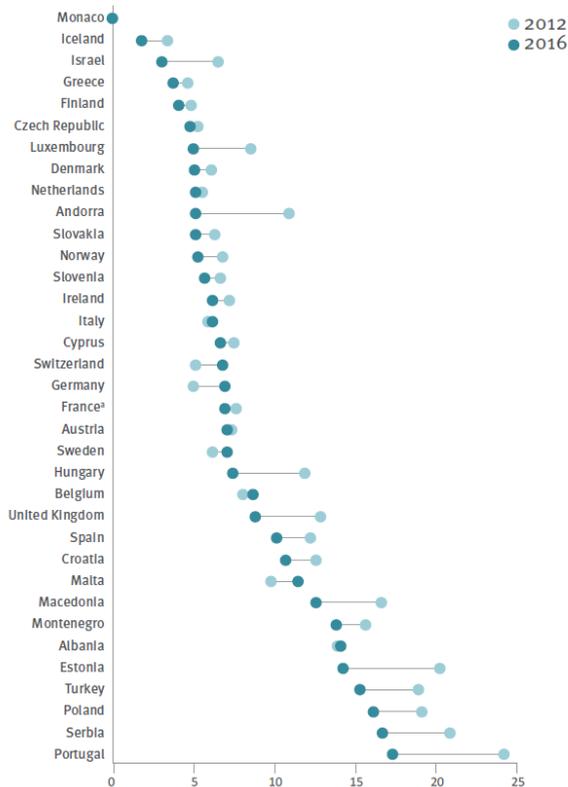


Figura 23. Tendencia en la tasa de notificación de TB por 100.000 habitantes entre los años 2012 y 2016 en países con menos de 20 casos por 100.000 habitantes en la Región Europea de la OMS.

Fuente: Informe de vigilancia y seguimiento de la Tuberculosis en Europa de 2018, datos de 2016 (4).

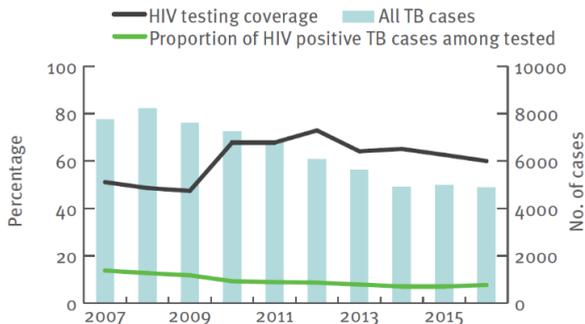


Figura 24. Coinfección TB - VIH. Años 2007 - 2016.

Fuente: Informe de vigilancia y seguimiento de la Tuberculosis en Europa de 2018, datos de 2016 (4).

1.1.4 Comunitat Valenciana

En la Comunitat Valenciana (CV) el informe anual sobre la tuberculosis es realizado por el Servicio de Vigilancia y Control Epidemiológico, dentro de la Dirección General de Salud Pública. En el informe del año 2017 (6), se declararon en la Comunitat 416 casos autóctonos de TB, lo que supuso una tasa de 8,4 casos por 100.000 habitantes. De esos casos, 385 fueron incidentes (92,5%), cuya tasa fue de 7,7 casos por 100.000 habitantes. La evolución de las tasas de TB en la CV ha ido disminuyendo de 2008 a 2014 de 15 casos por 100.000 habitantes a tasas por debajo de 10 (Figura 25). De 2014 a 2017 la tasa de TB parece haberse estabilizado en torno a 8-9 casos por 100.000 habitantes.

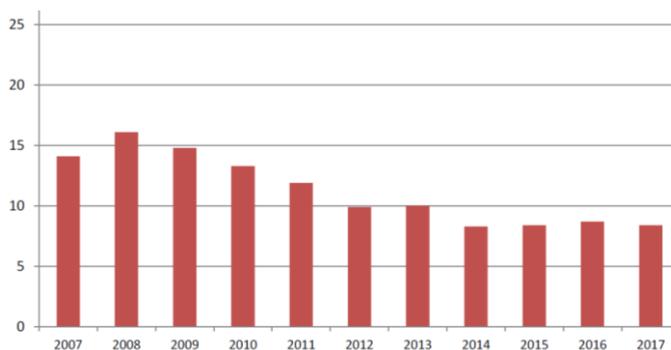


Figura 25. Evolución de las tasas de TB en la CV. Años 2007 - 2017.

Fuente: Informe sobre la TB en la CV, año 2017 (6).

Por lo que respecta a la mortalidad, de todos los casos de 2017 cinco fallecieron debido a la TB, lo que representó una tasa de mortalidad de 1,0 caso por 1.000.000 de habitantes.

La coinfección por el VIH fue del 4,3%, destacando que en el 94,5% de los casos se conocía el estado serológico de los pacientes frente a este virus.

En cuanto a la resistencia, el porcentaje de cepas resistentes a RMP y MDR fue del 3,0% y del 3,5%, respectivamente. Los casos MDR entre los casos nuevos fue del 2,2%, mientras que para los casos tratados previamente fue del 5,9%.

1.1.5 Departamento de Salud Valencia – Hospital General

La información sobre los casos de TB del DS se extrajeron del informe sobre TB en la CV del año 2017 (6). El DS Valencia-H. General presentó 32 casos de TB, lo que supuso una tasa de 9,0 casos por 100.000 habitantes. En la Figura 26 se muestra el posicionamiento de este Departamento de Salud respecto al resto de departamentos de la CV. La tasa de incidencia fue de 8,1 casos por 100.000 habitantes. El porcentaje de casos coinfectado TB-VIH fue del 6,3%.

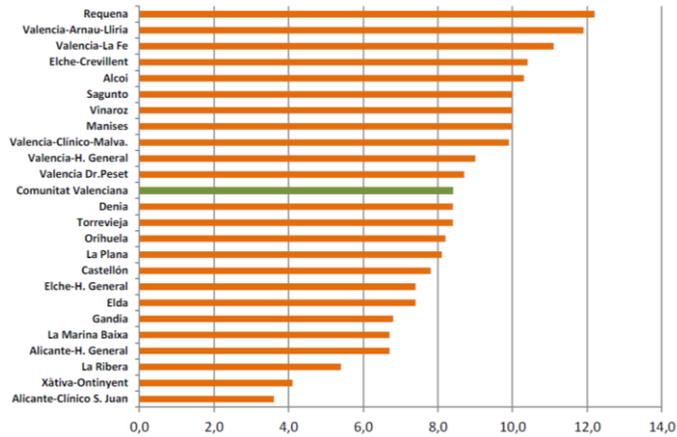


Figura 26. Tasas de TB por Departamento de Salud de la CV. Año 2017.
En verde se indica la media de la CV. Fuente: Informe sobre la TB en la CV, año 2017 (6).

1.2 Aspectos microbiológicos

La TB es una enfermedad producida por *Mycobacterium tuberculosis* o bacilo de Koch. Este agente causal fue aislado, descrito y responsabilizado de la TB en 1882 por el microbiólogo alemán Robert Koch, por lo cual recibió el premio Nobel de fisiología y medicina en 1905.

El género *Mycobacterium* es el único género de la familia *Mycobacteriaceae*, la cual se engloba a su vez dentro del Orden Actinomycetales. Este género presenta dos características principales, por un lado, su alto contenido en guanina y citosina en el ADN, entre 61 y 71%, excepto para *M. leprae* (55%). Y, por otro lado, la presencia de ácidos micólicos en su pared bacteriana. Estas características las comparten con otros géneros relacionados como *Gordonia*, *Tsukamurella*, *Nocardia* y *Rhodococcus* (7).

Las micobacterias son bacterias pleomórficas, pudiéndose visualizar como bacilos o cocobacilos, rectos o ligeramente curvados. Su tamaño oscila entre 0,2 - 0,6 μm de ancho por 1,0 - 10,0 μm de largo. Bajo ciertas circunstancias, pueden presentar un crecimiento ramificado. Son aerobias, no esporuladas (excepto *M. marinum* (8)), inmóviles y carecen de flagelos o cápsula (7,9,10). En cambio, poseen una pared celular gruesa y con un elevado contenido lipídico. Esta pared consta de cuatro capas: la más interna es el peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido N-glucolilmurámico (en lugar de N-acetilmurámico), dando rigidez y forma a la bacteria. La segunda posee arabinogalactanos que se encuentran unidos a los ácidos micólicos de la tercera capa. Los ácidos micólicos son ácidos grasos de cadena larga (60-90 átomos de carbono) de gran importancia taxonómica. Y finalmente la capa más externa, constituida por glicolípidos como el *cord*

factor (trehalosa-6,6'-dimicolato), presente solo en las especies integrantes del MTBC (10,11). En conjunto, esta composición de la pared le confiere a la micobacteria una escasa permeabilidad celular, responsable de la ineficacia de múltiples agentes antimicrobianos, así como de su característica ácido-alcohol resistencia (AAR). Además, determinados componentes de la pared, como el lipoarabinomanano, intervienen en la patogenia y favorecen la supervivencia del microorganismo en el interior de los macrófagos (10).

En comparación con otras bacterias, el crecimiento de la mayoría de las especies de micobacterias es lento, con tiempos de generación de hasta 20 horas en los medios habituales (7,9,10). Los requerimientos nutricionales para mayoría de las especies son relativamente simples, utilizando amoníaco o aminoácidos como fuentes de nitrógeno y glicerol como fuente de carbono en presencia de sales minerales. Su crecimiento es estimulado por el dióxido de carbono y por los ácidos grasos, que pueden proporcionarse en forma de yema de huevo o ácido oleico, aunque este último es tóxico en concentraciones altas y debe ser neutralizado con albúmina (7,9,10). Las temperaturas óptimas para el crecimiento varían ampliamente entre las especies (30 - 45°C), pero generalmente, suele ser de 35 - 37°C (7,9,10).

Otro aspecto a destacar de estos microorganismos es su resistencia a los ácidos, álcalis y determinados desinfectantes químicos, a pesar de no generar esporas. Resisten la desecación y la congelación, permitiéndoles sobrevivir durante semanas o meses en el medio ambiente, siempre que no les dé la luz del sol, pues los rayos ultravioletas son letales para ellos. También son sensibles al calor (> 65°C durante al menos 30 minutos), al óxido de etileno, formaldehído, etanol al 70%, glutaraldehído al 2%, ácido peracético o peróxido de hidrógeno estabilizado. No obstante, hay que tener en cuenta la posible presencia de materia orgánica, puesto que la presencia de proteínas puede ofrecer a la micobacteria cierta protección frente a determinados agentes desinfectantes haciéndolos inoperantes, como por ejemplo los alcoholes (7,9,10).

Con fines prácticos y desde un punto de vista patogénico las micobacterias se clasifican en tres grupos en función de la entidad nosológica producida: a) la TB producida por el MTBC (bacilo de Koch); b) la lepra por *Mycobacterium leprae* (bacilo de Hansen) y c) las micobacteriosis o patologías por micobacterias no tuberculosas (MNT), también denominadas "micobacterias atípicas" (10). En este trabajo nos centraremos en el agente causal de la TB, el MTBC (7,9,10,12,13).

1.3 El complejo *Mycobacterium tuberculosis*

El MTBC está comprendido por varias especies bacterianas y subespecies que comparten una identidad de secuencia del ADN del 99,9%, pero que se diferencian en su hospedador primario. En función de esta característica, los miembros de este complejo se clasifican en especies adaptadas a los humanos, especies adaptadas a otros mamíferos y *Mycobacterium canettii* (3).

Las especies del MTBC adaptadas a los humanos son *M. tuberculosis* en sentido estricto y *M. africanum*. Para estos microorganismos la especie humana es el único huésped conocido donde la infección y la transmisión ocurren de manera eficiente (14). Por contra, algunas de las especies del MTBC adaptadas a los animales son capaces de establecer infecciones y transmitirlas dentro de otras especies animales, aparte de sus hospedantes primarios. Las especies del MTBC adaptadas a los animales son: *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, el bacilo del Damán (*dassie bacillus*), *M. orygis*, *M. mungi*, *M. suricattae* y el bacilo del Chimpancé (*Chimpanzee bacillus*). A continuación, se resume brevemente la distribución geográfica, el rango de hospedadores y las características de virulencia de las especies adaptadas a los animales. *M. microti* se encuentra en roedores y musarañas, pero también se ha hallado en gatos domésticos de Reino Unido (15). El denominado bacilo del Damán es un patógeno del damán de El Cabo o damán roquero (*Procapra capensis*), un mamífero hiracoideo (16,17) del que toma su nombre. *M. pinnipedii* afecta a focas y leones marinos (18); no obstante, cepas similares a esta especie se han hallado en restos humanos de unos mil años de antigüedad en Perú (19). *M. caprae* se encuentra en cabras, pero también se ha descrito como causante de enfermedades en poblaciones de ciervos (20-22). Antiguamente estuvo considerada como una subespecie dentro de *M. bovis* (23,24). *M. bovis* se encuentra en el ganado, pero también puede infectar a otros animales domésticos y salvajes, así como a la especie humana (14,25). *M. orygis* se ha encontrado en mamíferos como el oryx, la gacela, el ciervo, el antílope y el búfalo, pero también en humanos del este y sureste de Asia (26,27). *M. mungi* se describió en poblaciones de mangosta en Botsuana (28) y *M. suricattae* en suricatos de Sudáfrica (29). Finalmente, mencionar que en chimpancés salvajes de Costa de Marfil se aisló una nueva cepa de MTBC (30), denominada *Chimpanzee bacillus*.

M. canettii también forma parte del MTBC, pero a diferencia de los otros miembros del complejo descritos anteriormente, esta especie presenta transferencia horizontal de genes y recombinación entre cepas, de forma similar a la que se da en otras bacterias recombinantes (31,32). Esto le ofrece una diversidad genética superior a la del resto de especies incluidas en el complejo. Este microorganismo forma parte de los llamados "bacilos tuberculosos lisos" (STB) debido a la morfología de sus colonias. Se han notificado unos 60 casos de infecciones en humanos, principalmente en el Cuerno de África. Este microorganismo parece afectar fundamentalmente a niños y a pacientes infectados por el VIH (33). La transmisión entre humanos de esta especie no ha sido demostrada; por lo que se cree que estas bacterias se adquieren probablemente del medio ambiente (34). Sin embargo, actualmente no se conoce ningún reservorio animal o ambiental que albergue esta especie. Finalmente, destacar que *M. canettii* es considerado el ancestro común más reciente de todos los miembros del complejo actual de *M. tuberculosis* (7,31,32,35).

Otra especie incluida dentro del MTBC es *M. bovis* BCG (Bacilo de Calmette-Guérin). Se trata de una cepa de *M. bovis* que fue distribuida por Calmette en 1924 a laboratorios de todo el mundo y que se ha mantenido *in vitro* mediante pases en serie (7). Actualmente, existe un conglomerado genéticamente heterogéneo de cepas BCG que se ajustan predominantemente a las propiedades descritas para *M. bovis*, salvo en su virulencia, ya que están más atenuadas (7). En muchas partes del mundo todavía se usa para vacunas, así como para el tratamiento del cáncer de vejiga. En raras ocasiones, BCG puede diseminarse como una complicación tanto de la inmunestimulación intravesical (36) como de la vacunación (37).

1.4 Filogenia del MTBC

Filogenéticamente, el complejo MTB se divide en dos grandes clados, en función de si presentan o no la delección *TbD1*. Las especies sin esta delección se consideran más antiguas en términos evolutivos que las cepas que sí la presentan, permitiendo su clasificación como se observa en la Figura 27 (38,39). El clado antiguo (*TbD1*-) está integrado por *M. canettii*, *M. africanum* (linaje 5 y linaje 6), *M. bovis* y otras cepas animales, así como determinados linajes de *M. tuberculosis* en sentido estricto, como son el linaje 1 y el linaje 7 (2,3,40). Mientras que, el clado moderno (*TbD1*+) está integrado por los linajes 2, 3 y 4 (2,3,40).

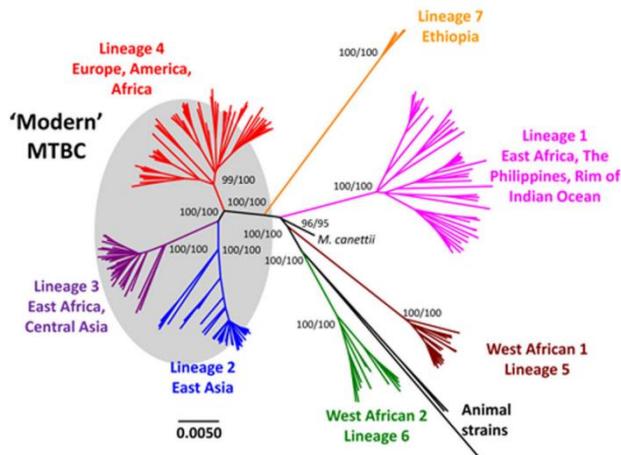


Figura 27. Filogenia del genoma completo de 220 cepas de MTBC. Se muestra el soporte de *bootstrap* para las ramas principales después de la inferencia con los análisis *Neighbor-joining* (izquierda) y máxima verosimilitud (derecha). La elipse gris engloba a las cepas "modernas" con la delección *TbD1*. Las barras de escala indican sustituciones por sitio. Fuente: Comas *et al.* (2).

Partiendo de la base de que *M. canettii* es considerado el ancestro común más probable del MTBC (7,31,32,35), en la Figura 27 también se observa como *M. africanum* y los linajes adaptados a los animales se separaron antes del ancestro común del complejo. Posteriormente, se produjo otra división que

dio lugar al ancestro del cual derivaron todos los linajes pertenecientes a *M. tuberculosis* en sentido estricto, siendo el linaje 1 el más basal dentro de este grupo de cepas, seguido por el linaje 7. Finalmente, un nuevo evento de divergencia (la delección TbD1) dio origen al ancestro de los linajes modernos 2, 3 y 4 (3).

Dentro del clado antiguo, *M. africanum* y las cepas de animales presentan la delección RD9 y una mutación en *phoPR* (G71S), no observadas en la especie *M. tuberculosis* en sentido estricto (38), como se muestra en la Figura 28. Por otro lado, dentro de la especie *M. africanum*, el linaje 5 se diferencia del linaje 6 y las cepas adaptadas a los animales, en que éstas últimas presentan además otras delecciones, como son RD7, RD8 y RD10 (Figura 28). Este hecho apoya la hipótesis de que *M. tuberculosis* no derivó de una cepa bovina durante la Revolución Neolítica, como tradicionalmente se ha postulado (3). Por tanto, en la actualidad se considera que es *M. bovis* quien evolucionó a partir de un ancestro común con el linaje 5 (3). Finalmente, destacar que las especies adaptadas a los animales están más estrechamente relacionadas con *M. africanum* linaje 6 que con el linaje 5 (3).

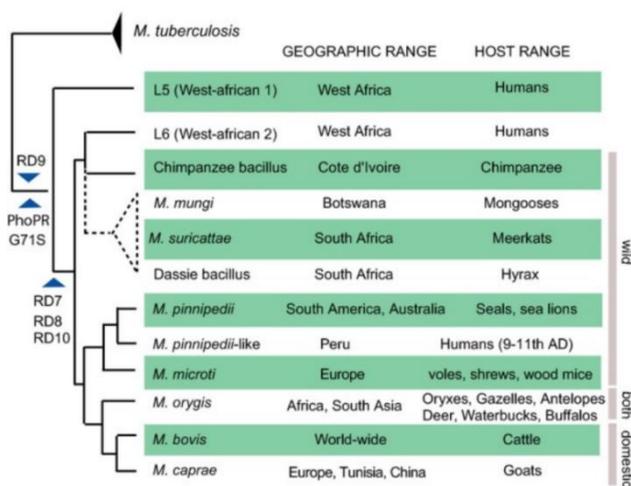


Figura 28. Esquema simplificado que ilustra las relaciones filogenéticas de las cepas animales basadas en diferentes filogenias publicadas previamente.

La longitud de las ramas no refleja distancias filogenéticas reales. Las ramas discontinuas representan supuestas relaciones relativas. Las posiciones filogenéticas de las delecciones genómicas y de las mutaciones en los genes *phoPR* están indicadas. La distribución geográfica y del hospedador de los linajes de animales no incluyen informes de zoológicos, ya que se consideraron infecciones incidentales. Fuente: Brites *et al.* (3).

Por otro lado, cabe indicar que también se han identificado subgrupos dentro de determinados linajes principales del MTBC, que se han denominado “sub-linajes”. En la Figura 29 se muestran los sub-linajes descritos por Stucki *et al.* (41) dentro del linaje 4.

Introducción

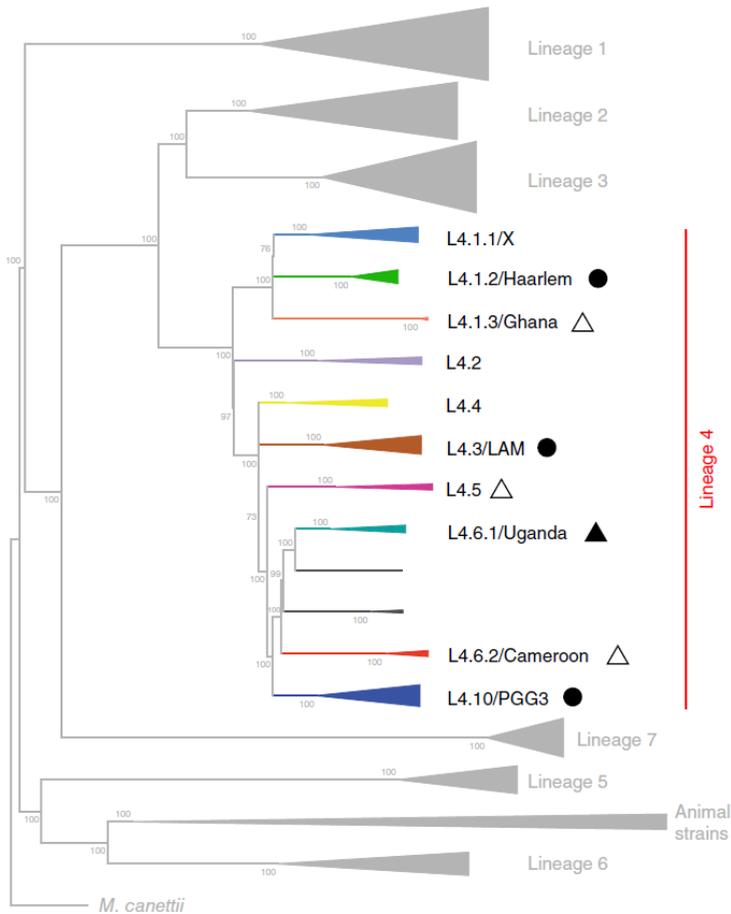


Figura 29. Definición de los sub-linajes del linaje 4. Fuente: Stucki *et al.* (41). Stucki *et al.* definió diez sub-linajes basándose en el análisis de 72 genomas secuenciados de MTBC pertenecientes al linaje 4 publicados previamente. Los sub-linajes fueron nombrados de acuerdo con Coll *et al.* (42) (siempre que sea posible) y las designaciones anteriores basadas en *spoligotyping*. Los triángulos negros representan sub-linajes identificados como especialistas y los círculos negros representan generalistas. Las formas rellenas corresponden a sub-linajes para los cuales realizaron análisis genómicos profundos.

Las inferencias filogenéticas más recientes revelan que los linajes adaptados a la especie humana del MTBC presentan una fuerte estructura filogeográfica, lo que indica que los siete linajes principales evolucionaron de un ancestro común y se diversificaron hacia diferentes regiones del mundo (43-48).

El linaje 1 también conocido como Indo-Oceánico, se distribuye alrededor del Océano Índico y Filipinas (49). El linaje 2 se da en los países de Asia oriental; no obstante, dentro de este linaje se incluye la familia Beijing, la

cual está ampliamente distribuida a nivel mundial. El linaje 3 se localiza fundamentalmente en África oriental y en Asia central y meridional (45). El linaje 4 también denominado euroamericano, está ampliamente expandido alrededor del mundo. El linaje 5 (denominado África Occidental 1) y el linaje 6 (África Occidental 2) están restringidos geográficamente a países de África Occidental (50). Y finalmente, el linaje 7 que solo se ha encontrado en Etiopía o en personas procedente de este país (48), de ahí que también reciba el nombre de linaje etíope.

Como se ha podido comprobar, algunos linajes están ampliamente distribuidos (“generalistas”), mientras que otros están restringidos a determinadas regiones (“especialistas”) (41). Actualmente, se desconoce la razón de dicha distribución, pero podría estar relacionada con distintos factores, tanto del microorganismo como del hospedador (3). Según lo comentado anteriormente, los linajes 5, 6 y 7 están geográficamente restringidos en comparación con los linajes 2 y 4.

Esta distribución filogeográfica también se da en los sub-linajes del linaje 4 (41). Así, los sub-linajes L4.1.2 (Haarlem) y L4.3 (LAM) están ampliamente extendidos, mientras que otros sub-linajes como el L4.1.3 (Ghana), L4.5, L4.6.1 (Uganda) y L4.6.2 (Cameroon), solo se han encontrado en unos pocos países.

1.5 Transmisión, patogenia e inmunidad

El mecanismo de transmisión más importante de este microorganismo es la vía aérea. Los pacientes con tuberculosis pulmonar, especialmente los bacilíferos, eliminan múltiples gotas en forma de aerosol cargadas de bacilos. Esto se produce al hablar, estornudar y, sobre todo, al toser. No obstante, solo las gotitas de 1 a 5 μm son las que pueden alcanzar la región alveolar y producir la infección (12,51). Además de la vía aérea, también se han descrito otros mecanismos de transmisión, como son la vía digestiva en el caso de *M. bovis* a partir de lácteos no pasteurizados procedentes de ganado bovino infectado (segunda en frecuencia), la vía urogenital (inmunoterapia contra el cáncer de vejiga), vía mucocutánea/inoculación y vía transplacentaria (10).

Teniendo en cuenta la vía principal de transmisión, cuando los bacilos tuberculosos llegan a los alvéolos, éstos son fagocitados por los macrófagos alveolares (inmunidad innata). Los bacilos contenidos en los fagosomas inhiben la formación del fagosoma-lisosoma debido al efecto del lipoarabinomano presente en la pared micobacteriana (51). Esto permite que la bacteria pueda sobrevivir y multiplicarse en su interior. A partir de aquí, la infección puede diseminarse a través de los vasos linfáticos regionales y, posteriormente, por vía hematógena alcanzar otros órganos. Esta diseminación suele ser silente y se acompaña de la aparición de la hipersensibilidad retardada o inmunidad celular (tipo IV) (12). Este proceso se inicia con el reconocimiento por parte de los linfocitos T CD4⁺ (linfocitos colaboradores - Th) de los antígenos micobacterianos procesados y presentados por los

Introducción

macrófagos a través del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II). Todo ello junto a la presencia de la interleucina 12 (IL-12), liberada por los macrófagos y las células dendríticas, permiten su activación y diferenciación hacia linfocitos Th efectores tipo 1 (Th1), así como su proliferación. Los linfocitos Th1 activados secretan linfocinas, en especial interferón- γ (IFN- γ), que atraen, retienen y activan a los macrófagos en el lugar del antígeno. Los macrófagos activados acumulan altas concentraciones de enzimas líticas y metabolitos reactivos que mejoran en gran medida su actividad micobactericida. No obstante, si estas enzimas y metabolitos de los macrófagos se liberan a los tejidos circundantes, pueden originar necrosis tisular. Los macrófagos activados también secretan algunos factores reguladores, como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), que junto con los secretados por los linfocitos (IFN- γ) determinan la respuesta anatomopatológica y clínica. Histológicamente, destacan las denominadas células epitelioides características del granuloma tuberculoso, que son en realidad macrófagos muy estimulados. Las células epitelioides a su vez se fusionan alrededor del antígeno tuberculoso disponiendo sus núcleos hacia la periferia, constituyendo las denominadas células gigantes de Langhans. Siendo éstas el resultado de la respuesta tisular más exitosa del hospedador (12,52,53).

En personas con infección tuberculosa latente (ITL), es posible que los focos endógenos se reactiven repetidas veces, pero que se mantengan controlados gracias a la vigilancia activa llevada a cabo por los linfocitos T CD4⁺, manteniendo al bacilo en estado quiescente (12). Este hecho determina la complejidad epidemiológica de este patógeno.

Además de la importancia de los linfocitos T CD4⁺, existen otros subgrupos de linfocitos T, como los CD8⁺, que contribuyen al control de esta enfermedad (51). Así, las células T CD8⁺ se han asociado con efectos citotóxicos, destrucción de las células infectadas y con la liberación de IFN- γ y TNF- α .

Cuando la población de linfocitos Th1 activados alcanza cierto tamaño, se manifiesta la reactividad retardada cutánea a la tuberculina o hipersensibilidad tisular. El tiempo necesario para su desarrollo es variable, aunque en general se necesitan de 3 a 12 semanas desde que se produjese la infección (12,54). Esta reactividad es la base para las pruebas cutáneas con tuberculina (TST), utilizadas para la detección de la infección por *M. tuberculosis* en individuos asintomáticos.

Las características anatomopatológicas de la TB son el resultado del grado de hipersensibilidad y de la carga antigénica local. Si la concentración de antígeno es mínima y la hipersensibilidad tisular es alta, la organización de linfocitos, macrófagos, células gigantes de Langhans, fibroblastos y capilares conduce a la formación de granulomas (tubérculos). Los focos caracterizados por los tubérculos duros resultantes se denominan proliferativos o productivos, constituyendo una reacción tisular exitosa con limitación de la infección, curación con fibrosis eventual y formación de cicatrices (12).

Cuando tanto la carga antigénica como el grado de hipersensibilidad son altos, las células epitelioides y las gigantes son escasas o están ausentes; los linfocitos, los macrófagos y los granulocitos se presentan de una forma menos organizada y puede aparecer necrosis tisular. A este tipo de reacción tisular se le denomina exudativa. En ausencia de necrosis, las lesiones exudativas pueden curarse por completo, pero lo más frecuente es que se dé cierto grado de necrosis tisular. La necrosis de la TB tiende a ser incompleta y conduce a material acelular y amorfo sólido o semisólido denominado caseoso. El pH ácido del medio y la baja tensión de oxígeno en el material caseoso sólido tienden a inhibir la multiplicación microbiana. No obstante, la necrosis caseosa es inestable, sobre todo a nivel pulmonar, donde tiende a licuarse y eliminarse a través del árbol bronquial, originando una cavidad tuberculosa. En la cual se dan las condiciones óptimas para que la población micobacteriana alcance títulos de 5 a 6 logaritmos, superiores a las que se observan en lesiones no cavitadas. Además, el material infeccioso de una cavidad puede movilizarse a nuevos focos pulmonares (12).

Finalmente, cuando el grado de hipersensibilidad es muy bajo la reacción tisular puede ser inespecífica, lo que implica la presencia de algunos leucocitos polimorfonucleares y células mononucleares con grandes cantidades de bacilos tuberculosos. A esta afección se le denomina tuberculosis arreactiva (12).

En cuanto a la virulencia de *M. tuberculosis*, destacar que este microorganismo ha desarrollado múltiples mecanismos para interferir con el sistema inmunitario del hospedador, muchos de los cuales están mediados por componentes específicos de la pared celular micobacteriana y otras moléculas, pudiendo modular diversos aspectos de la respuesta inmunitaria tanto innata como adaptativa (55,56). *M. tuberculosis* es capaz de interferir en la fagocitosis y en la fusión del fagosoma-lisosoma (57), inducir la producción de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 por las células dendríticas (58), interferir en la señalización del interferón- γ (59) y conducir a la expresión preferencial de la IL-4 (60,61), desviando así la respuesta inmunológica hacia una respuesta no protectora de linfocitos Th2, en lugar de una mediada por linfocitos Th1. También tiene la capacidad de inhibir la producción de citoquinas, la presentación de antígenos y la expresión del MHC-II en células presentadoras de antígenos (62,63).

Varios estudios sugieren que existen diferencias entre linajes/sub-linajes del MTBC en cuanto a los efectos inmunomoduladores que generan en el hospedador (3,64). Algunos de ellos inducen una fuerte expresión de citoquinas proinflamatorias, como son el TNF- α , la IL-1 β , la IL-12 y el IFN- γ , permitiendo una respuesta inmunitaria protectora Th1 (52,53). En cambio, otros linajes se asocian con una expresión reducida de citocinas proinflamatorias y una mayor producción de citocinas desactivadoras de los macrófagos, como la IL-11 y la IL-13 (53,65). Por tanto, al generar una respuesta inmunológica proinflamatoria reducida y/o retardada, estos linajes se

asocian con una mayor virulencia y transmisibilidad, lo que se ha observado en los linajes modernos, sobre todo, en el linaje 2 y 4 (3,66,67).

1.6 Aspectos clínicos de la tuberculosis

La enfermedad tuberculosa suele clasificarse en función de su origen en pulmonar o extrapulmonar. La más frecuente es la pulmonar, aunque una tercera parte de los casos presentan TB pulmonar y extrapulmonar o sólo extrapulmonar (10,12,51).

1.6.1 *Tuberculosis pulmonar*

El periodo de incubación suele ser de unas cuatro semanas tras el contagio (54), momento en el que suelen aparecer las lesiones más precoces. La enfermedad clínica que aparece poco después de la infección se denomina TB primaria o primoinfección. La enfermedad suele desarrollarse en un 5% de los pacientes infectados (10), siendo más común en niños menores de cinco años y en personas inmunodeprimidas (51). En general, cursa de forma asintomática o paucisintomática, produciendo una neumonitis inespecífica que afecta fundamentalmente a los lóbulos medios e inferiores, acompañándose de adenopatías hiliares o paratraqueales (12,51). A esta combinación de neumonitis, linfangitis y adenitis se le denomina “complejo primario de Ghon” (51,68). En determinadas circunstancias, como desnutrición o inmunodepresión, la TB pulmonar primaria puede agravarse rápidamente, produciendo manifestaciones clínicas. Una de las más frecuentes es el derrame pleural, debido a la penetración en el espacio pleural del microorganismo procedente de un foco adyacente (51). La manifestación más grave de la infección primaria es la diseminación hematógena (51).

Sin embargo, en la mayoría de los casos el bacilo de Koch permanece latente y persiste así durante años. Solo en un 5-10% de los casos se desarrollará la enfermedad en algún momento de la vida, como consecuencia de una reactivación (7,10,51). No obstante, la probabilidad de que ésta se produzca depende de diversos factores relacionados con la inmunidad celular del hospedador, como por ejemplo el nivel de linfocitos T CD4⁺. Este hecho se comprobó al observar que en pacientes muy inmunodeprimidos con SIDA la reactivación se daba en casi la mitad de los casos (7,10,69). Esta enfermedad originada por la reactivación endógena de una ITL se denomina TB secundaria o posprimaria (51) y suele darse en la edad adulta. Afecta fundamentalmente a los segmentos apicales y posteriores de los lóbulos superiores y a los segmentos superiores de los lóbulos inferiores (12,51). Suele ser un proceso insidioso, progresivo y caracterizado por una inflamación crónica, caseosa y con formación de cavidades. Por tanto, estos casos presentan un mayor riesgo de transmisión que la TB primaria (7,51).

1.6.2 *Tuberculosis extrapulmonar*

Fuera del pulmón, los sitios más frecuentes donde se localiza la TB son, por orden de frecuencia: ganglios linfáticos, pleura, aparato genitourinario, huesos y articulaciones, meninges, peritoneo y pericardio (12,51,54,70). No obstante, prácticamente todos los órganos y aparatos pueden resultar afectados (51). Estas formas extrapulmonares suelen ser más frecuentes en pacientes con una inmunodepresión importante, como sucede en los pacientes con SIDA (10).

1.6.2.1 *Linfadenitis tuberculosa*

Constituye la forma más frecuente de TB extrapulmonar. Es la manifestación más habitual en niños y en adultos coinfectados por el VIH. Puede aparecer como una enfermedad localizada fundamentalmente en los ganglios linfáticos cervicales y de la región supraclavicular o bien, en forma de adenopatías generalizadas. El ganglio tiene consistencia gomosa, no suele ser doloroso y puede fistulizar a piel drenando de forma espontánea material caseoso (escrófula) (51,71).

1.6.2.2 *Pleuritis tuberculosa*

Puede ser la manifestación de una primoinfección en niños y adultos jóvenes, originando un cuadro de derrame pleural (51). Suele ser unilateral y de comienzo brusco. En el análisis citobioquímico del líquido pleural suele existir un predominio linfocitario, escasez de células mesoteliales, elevación de la adenosina desaminasa (ADA) y cifras bajas de amilasa (51). La presencia de *M. tuberculosis* en el líquido pleural es poco frecuente, por lo que habitualmente debe realizarse una biopsia pleural (51). La prueba de la tuberculina puede ser negativa hasta en una tercera parte de los casos.

1.6.2.3 *Tuberculosis genitourinaria*

Se produce por diseminación hematógica, afectando inicialmente al riñón y, posteriormente, puede extenderse por la vía urinaria hacia uréter, vejiga y órganos genitales (51). Cursa típicamente con un cuadro de síndrome miccional, piuria estéril y hematuria (51).

1.6.2.4 *Osteomielitis tuberculosa*

Afecta fundamentalmente a la columna dorsal (enfermedad de Pott o espondilitis tuberculosa), produciendo una destrucción importante de los cuerpos vertebrales, con dolor y cifosis (51). Pueden existir abscesos fríos paravertebrales, que se extienden por las fascias y drenan en localizaciones lejanas a la columna. La TB articular afecta generalmente a grandes articulaciones de carga, como caderas y rodillas (51).

1.6.2.5 *Meningitis tuberculosa*

Suele ser una forma de meningitis subaguda o crónica que afecta fundamentalmente a la base encefálica y se acompaña de parálisis de los pares craneales (especialmente, los oculares), confusión, letargia y signos meníngeos; ocasiona secuelas neurológicas en hasta el 25% de los casos tratados (51). El líquido cefalorraquídeo suele presentar linfocitosis, aunque en fases muy precoces la pleocitosis es de predominio polimorfonuclear. Las proteínas suelen estar aumentadas y la glucosa baja (51). Se suele dar en niños menores de cinco años, originando con frecuencia una enfermedad miliar-meníngea (12). Algunos pacientes desarrollan tuberculomas meníngeos o cerebrales que cursan con convulsiones y se manifiestan años después de la infección meníngea (51).

1.6.2.6 *Tuberculosis diseminada o miliar*

Se produce por diseminación hematogena en personas con alteraciones graves del sistema inmunitario. También es frecuente en niños y ancianos. Presenta un comienzo clínico agudo o insidioso, predominando los síntomas constitucionales y la fiebre. El fondo de ojo puede evidenciar la presencia de tubérculos en las coroides, considerándose patognomónicos, aunque poco frecuentes (51). La radiografía de tórax suele presentar un patrón en “grano de mijo” (51).

1.6.2.7 *Serositis, pericarditis y peritonitis*

Del mismo modo que en la pleuritis, la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes es poco frecuente, por lo que el diagnóstico suele ser difícil. La determinación del ADA es de gran utilidad. La peritonitis tuberculosa suele adquirirse por contigüidad a la TB intestinal (51). Esta última produce un cuadro clínico muy semejante a la enfermedad inflamatoria intestinal, siendo el íleo distal y el ciego las localizaciones más frecuentes (51).

1.6.2.8 *Tuberculosis cutánea*

Infrecuente en la actualidad, puede presentar diversas formas: lupus vulgaris, eritema indurado de Bazin, lesiones miliares, úlceras o abscesos.

1.7 Diagnóstico de la tuberculosis

El diagnóstico de esta enfermedad se lleva a cabo en función de las características clínicas, radiológicas, anatomopatológicas y microbiológicas, así como de otras pruebas complementarias. Sin embargo, el papel de la microbiología es fundamental, brindando la posibilidad de detectar la presencia de los bacilos en la muestra tanto microscópicamente como mediante técnicas de biología molecular, así como de aislar el agente causal en cultivo, clave para el diagnóstico definitivo de TB (10). Además, una vez obtenido el agente etiológico se puede estudiar *in vitro* su sensibilidad frente a los

antimicrobianos y someterlo a estudios moleculares para su vigilancia epidemiológica (10).

1.7.1 Diagnóstico Clínico

Para el diagnóstico de la TB es esencial mantener siempre un alto índice de sospecha. Por consiguiente, en todo paciente con síntomas respiratorios y/o síntomas generales de más de 2 - 3 semanas de duración es recomendable iniciar los procedimientos diagnósticos, así como en todo paciente con hemoptisis, con independencia de la duración (71).

1.7.1.1 Semiología

La TB pulmonar temprana suele ser asintomática y, por lo general, se descubre casualmente en una radiografía de tórax (12). Sin embargo, a medida que aumenta la población bacilar, se pueden producir síntomas constitucionales inespecíficos, como anorexia, fatiga, pérdida de peso, sensación de escalofríos, fiebre y diaforesis nocturna (7,12,54,70). Estas últimas manifestaciones son de inicio gradual y pueden ser bien toleradas por los pacientes, de ahí la relevancia de una buena anamnesis. Los síntomas locales indican una enfermedad avanzada. Generalmente, se presenta tos productiva, la cual suele ser leve y bien tolerada, pero puede volverse molesta cuando la afectación bronquial es extensa (12). Estos síntomas (tos y expectoración mucopurulenta) pueden ser ignorados por los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (12). Otros posibles síntomas son la disnea, el dolor torácico y la hemoptisis (12,51). El dolor torácico suele relacionarse con la extensión de la inflamación a la pleura (12).

Por otro lado, las manifestaciones de la TB extrapulmonar incluyen linfadenitis cervical, meningitis, pleuritis, pericarditis, sinovitis, pielonefritis e infecciones de la piel, articulaciones, huesos y otros órganos (7,12,54,70). Visto en el apartado 1.6.2.

La enfermedad pulmonar en los pacientes con SIDA suele diferir del cuadro clínico ordinario de la tuberculosis, tanto en los hallazgos radiológicos como en su rápida progresión. En estos pacientes se observan con más frecuencia las manifestaciones extrapulmonares y la enfermedad diseminada, incluso a veces sin la formación de granulomas (7,12,70).

1.7.1.2 Examen físico

Los hallazgos físicos son inespecíficos y suelen subestimar la extensión de la enfermedad, pudiendo estar ausentes incluso en algunos casos. Los estertores puede que solo se aprecien cuando el paciente inspira después de una tos breve (estertores postusivos) y es posible que persistan mucho tiempo después de la curación debido a la distorsión permanente de las vías aéreas pequeñas (12). En las lesiones grandes se pueden auscultar signos de consolidación con bronquios permeables (pectoriloquia áfona, ruido respiratorio bronquial o soplo tubárico) (12). Y sobre las cavidades se

Introducción

auscultan ruidos respiratorios huecos y distantes denominados anfóricos (12). La matidez con vibraciones vocales disminuidas puede indicar engrosamiento o líquido pleural (12).

1.7.1.3 Hallazgos radiológicos

La radiografía de tórax es fundamental para el diagnóstico clínico. También es importante para la determinación de la extensión y las características de la enfermedad, así como la evaluación de la respuesta al tratamiento. Algunos patrones son muy sugestivos de TB, pero no son patognomónicos. Por ejemplo, un infiltrado focal o nodular en las áreas apicales o subapicales posteriores de los lóbulos superiores o en el segmento superior del lóbulo inferior, hace sospechar en gran medida de una TB crónica temprana (12). La bilateralidad y la asociación con la formación de cavidades incrementa esta sospecha (Figura 30).



Figura 30. Radiografía torácica que muestra un infiltrado cavitado en el lóbulo superior derecho en un paciente con tuberculosis activa.

Tanto la cronicidad como las características histopatológicas se pueden estimar mediante la radiografía de tórax. Las lesiones granulomatosas (productivas) tienden a ser pequeñas, nodulares y bien definidas, lo que indica la presencia de pocos microorganismos y una buena respuesta inmunitaria del hospedador. Las lesiones neumónicas (exudativas) tienden a presentar límites indefinidos y suaves, siendo más inestables. Las cicatrices fibróticas tienen márgenes profundos y tienden a contraerse. La caseificación produce mayor densidad. Las lesiones exudativas en curación primero se tornan más pequeñas y menos densas y posteriormente, a medida que se desarrollan las cicatrices, se tornan mejor definidas. La TB de los lóbulos inferiores es radiológicamente inespecífica. Mientras que, la neumonía asociada con la adenopatía hiliar sugiere una TB primaria (12). Otros patrones radiológicos asociados a una TB

pueden ser: una neumonía mal resuelta, atelectasias, lesiones ocupantes de espacio o grandes cavidades con niveles hidroaéreos.

La tomografía computarizada puede ser útil en la interpretación de datos cuestionables mediante la radiografía torácica simple y puede ser de utilidad en el diagnóstico de algunas formas de TB extrapulmonar, como por ejemplo la enfermedad de Pott (51). La resonancia magnética se emplea en el diagnóstico de la TB intratecal (51).

1.7.2 Diagnóstico Microbiológico

La confirmación del diagnóstico de la TB se sustenta en el diagnóstico microbiológico, basado en la microscopía, el cultivo y las técnicas moleculares.

1.7.2.1 Tipos de muestras

La selección de la muestra dependerá primordialmente de la sintomatología del paciente y de su patología de base (10).

Ante clínica respiratoria, la muestra más frecuente y rentable es el esputo espontáneo. Las principales guías recomiendan su recogida matutina en ayunas durante tres días consecutivos (7,10,72). En los casos en que no es posible conseguir una expectoración espontánea se inducirá el esputo mediante nebulizaciones con soluciones salinas (7,10). Si aun así no se consiguen muestras de calidad, se puede recurrir a técnicas broncoscópicas, como el aspirado bronquial (BAS), el lavado broco-alveolar (BAL) o el cepillado bronquial con catéter telescopado. Otras muestras respiratorias son las biopsias bronquiales, transbronquiales, pulmonares o pleurales.

En niños, la muestra de elección es el jugo gástrico (10), pero debido a la acidez de este tipo de muestra, requieren de un rápido envío y procesamiento. Si no fuese posible su procesamiento en las cuatro horas siguientes a su recogida se debe neutralizar con carbonato sódico.

Cuando se sospeche de una infección diseminada es necesario el cultivo de muestras de territorios estériles. Las muestras con un mayor rendimiento son la sangre y la médula ósea (10). Otras muestras son las biopsias de ganglios linfáticos, bazo e hígado. La sangre y la médula ósea, así como otras muestras sanguinolentas, destinada al cultivo se deben transportar en contenedores que lleven anticoagulante, como el polianetol sulfonato sódico (SPS), heparina o citrato, pero nunca con EDTA (10). En cambio, las destinadas a técnicas de biología molecular sí deben emplear el EDTA como anticoagulante. Para el cultivo de sangre y médula ósea se recomienda su inoculación en medios específicos de sistemas con lectura automatizada, como por ejemplo los frascos BD BACTEC™ Myco/F Lytic (Becton Dickinson) (7), que contiene caldo Middlebrook 7H9 suplementado y caldo de infusión de cerebro y corazón. Otro de estos medios es el BacT/Alert MB Blood (Biomérieux) (7). Por lo que respecta al resto de líquidos estériles, es

Introducción

importante recoger el mayor volumen posible (10-15 ml), debido a que estas muestras suelen ser paucibacilares. Puesto que algunos líquidos como los articulares contienen una elevada cantidad de fibrinógeno, deberían recogerse en tubos con anticoagulante, según lo indicado anteriormente (10). Estas muestras nunca se deben recoger con hisopo (7). Por otro lado, las biopsias de tejidos deben enviarse en suero fisiológico para evitar la deshidratación (7,10).

La orina se debe recoger con las mismas precauciones que en la obtención de cualquier urocultivo. Pero con las siguientes salvedades: i) se debe indicar en la petición la sospecha de TB urinaria, ii) es aconsejable recoger tres muestras de al menos 40 ml durante tres días consecutivos y iii) debe evitarse el uso de ácido bórico como conservante (7,10).

Para el estudio micobacteriológico de las heces se recomienda al menos 1 g de muestra. Se deben procesar inmediatamente, añadiendo 5 ml de medio líquido Middlebrook 7H9 o suero fisiológico a la muestra previamente al inicio de la digestión-descontaminación.

1.7.2.2 Técnicas de microscopía

Actualmente, la microscopía es el procedimiento más simple, rápido y económico en proporcionar una orientación diagnóstica preliminar para el clínico. Por lo cual, suele aplicarse sistemáticamente sobre cualquier muestra clínica en la que se sospeche de TB o cualquier otra micobacteriosis. No obstante, una tinción negativa no la descarta (7,10). Además, con esta técnica es posible valorar la calidad de las muestras recibidas, identificar los pacientes más contagiosos y monitorizar la respuesta al tratamiento antituberculoso (7,10).

Es conocido que las micobacterias son microorganismos difíciles de teñir con los colorantes básicos habituales. De hecho, la tinción de Gram no es adecuada, puesto que estas bacterias no se tiñen y aparecen como zonas claras o “fantasmas” en la preparación (véase la Figura 31A). Esto se debe al elevado contenido lipídico de la pared celular micobacteriana, especialmente en ácidos micólicos (7,10).

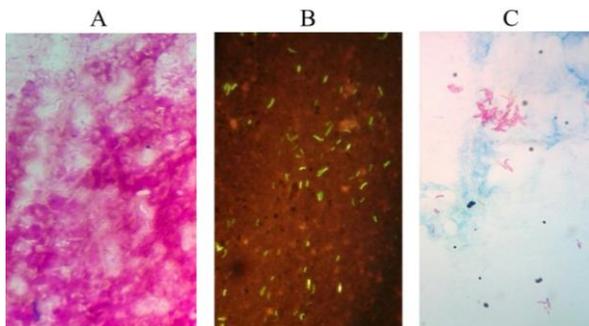


Figura 31. Tinciones realizadas sobre una muestra directa positiva.

A) Tinción de Gram: se aprecian las sombras de los bacilos no teñidos a modo de tinción negativa. B) Tinción con fluorocromos (auramina): los BAAR se observan con fluorescencia amarillo-verdosa sobre fondo rojizo. C) Tinción de Ziehl-Neelsen: los BAAR se observan teñidos de rojo.

Por tanto, para conseguir que el colorante primario penetre en el interior de la micobacteria se debe recurrir al calor o a determinados agentes tensoactivos. Una vez en su interior, el colorante ya no puede ser extraído tras la exposición al alcohol-ácido. A esta propiedad se le denomina ácido-alcohol resistencia (AAR) y se emplea para la visualización de este grupo específico de bacterias. Su mecanismo exacto se desconoce, pero se piensa que es el fenol quien permite la penetración del colorante con ayuda del calor (7,10). Además, los colorantes con estructuras derivadas del arilmetano (fucsina o auramina O) son capaces de formar complejos estables con la pared micobacteriana (7,10). Estas propiedades se aprovechan en los métodos de tinción más utilizados para la detección de bacilos ácido alcohol-resistentes (BAAR), los cuales se muestran en la Tabla 2. En dicha tabla se muestra como las técnicas fluorescentes requieren de un menor esfuerzo para el microscopista al poder observar la preparación a menor aumento sin que conlleve una pérdida de sensibilidad. Por ello se recomiendan como método de cribado en los laboratorios con un gran número de muestras (7,10). Los casos dudosos y positivos se deben confirmar mediante la realización de una tinción de Ziehl-Neelsen. En cuanto al método de la carbolfucsina fría de Kinyoun, indicar que su rentabilidad parece ser inferior a los otros dos métodos comentados (7,10).

Tabla 2. Tinciones empleadas para el diagnóstico de micobacterias mediante microscopía. Abreviaturas: C1 - colorante primario; Δ - calentamiento; CC - contracolorante; n - número; BAAR - bacilos ácido-alcohol resistentes; S - sí; N - no; UV - ultravioleta.

Tinción	C1	Δ	CC	Aumento/ n campos	Observación BAAR
Ziehl-Neelsen	Carbolfucsina*	S	Azul de metileno o Verde de malaquita	x 1.000/ 300	Rojos sobre fondo azul o verde
Kinyoun	Carbolfucsina* tensoactiva	N			
Auramina	Auramina O	N	Rojo de tiazina o Permanganato	x 250/30 o	Bajo luz UV fluorescencia amarilla o anaranjada
Auramina-Rodamina	Auramina O + Rodamina B	N	potásico	x 450/70	

*El término carbolfucsina equivale a fucsina fenicada.

Por otro lado, debido a que pueden existir artefactos AAR en una preparación, es necesario observar cuidadosamente la morfología celular. El MTBC aparece como BAAR de 1,0 a 10,0 μm de largo y 0,2 a 0,6 μm de ancho. Pueden ser rectos o ligeramente curvados y encontrarse aislados o formando pequeñas agrupaciones. En la tinción de Ziehl-Neelsen pueden teñirse de forma irregular debido a la presencia de granulaciones a lo largo de la bacteria (7,10). Figura 31C y Figura 32.

En el informe de la baciloscopía se debe indicar si ésta es negativa o positiva y, en los casos positivos, informar la cantidad de BAAR observados

Introducción

para valorar el seguimiento del tratamiento (71). Esta técnica permite un diagnóstico provisional de TB junto con la sospecha clínica.

La sensibilidad de la microscopía oscila entre un 22% y un 80% respecto al cultivo (7,10). Este amplio rango se debe a que esta técnica está influenciada por diversos factores, como son: la experiencia del microscopista, la cantidad de BAAR presentes, el tipo de muestra, la técnica de tinción, la población de pacientes evaluada y la existencia de pretratamiento o no antes de la preparación de la extensión (7,10). De forma general, se estima que el límite de detección de las técnicas basadas en microscopía es de unos 5.000-10.000 microorganismos/ml de muestra (12,73). Por tanto, una baciloscopia negativa nunca descarta la enfermedad (71).

La especificidad del examen directo de la muestra para determinar el género *Mycobacterium* es bastante elevada, pero no es posible la diferenciación de especies. Además, no hay que olvidar que existen otros microorganismos que pueden presentar diferentes grados de AAR como son: *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella*, *Gordonia*, *Legionella micdadei* y los ooquistes de *Cryptosporidium*, *Isospora*, *Sarcocystis* y *Cyclospora*, así como las esporas de *Microsporidium* (7,10). En cambio, en medio de cultivo líquido, la morfología microscópica se ha utilizado para la identificación presuntiva de algunas micobacterias frecuentes (7,10). Es el caso del MTBC, que a menudo exhibe un aspecto de cuerdas serpenteantes (véase la Figura 32). No obstante, esto también puede ocurrir con algunas MNT, como *M. kansasii* (10).



Figura 32. Tinción de Ziehl-Neelsen realizada a partir de un MGIT positivo. Se observan BAAR con *cord factor* positivo.

1.7.2.3 Técnicas de cultivo

El cultivo permite la identificación de la especie, los estudios de sensibilidad frente a los antituberculosos, la monitorización del tratamiento, la confirmación de la curación en los pacientes tratados y la realización de estudios de epidemiología molecular (7,10). El límite de detección de esta técnica se ha establecido en 10-100 microorganismos viables/ml, por lo que es

más sensible que el examen microscópico (7,10). Actualmente es considerado el método de referencia (73).

Es importante destacar que la identificación por cultivo del MTBC supone el diagnóstico definitivo (51). Sin embargo, su cultivo entraña una serie de dificultades relacionadas con su lento crecimiento. Por tanto, requieren de largos periodos de incubación, permitiendo que en los cultivos de muestras obtenidas de sitios no estériles puedan crecer una gran variedad de microorganismos distintos de los buscados. Esto puede interferir de forma crítica en el diagnóstico microbiológico. Por consiguiente, en ese tipo de muestras se deben seleccionar procedimientos adecuados para su pretratamiento antes de la siembra, así como escoger los medios de cultivo y las condiciones de incubación más apropiados para facilitar la recuperación óptima de las micobacterias (7). Todos estos procedimientos deben llevarse a cabo en campana de seguridad biológica de clase IIA.

1.7.2.3.1 Pretratamiento

Las muestras obtenidas de zonas no estériles donde existe una compleja matriz orgánica contaminada con una gran variedad de microorganismos deben someterse a un tratamiento antes del cultivo (7,10). En cambio, si se trata de tejidos o líquidos normalmente estériles, estas muestras no deben descontaminarse, ya que podría originar cierta pérdida de viabilidad micobacteriana (7,10).

El pretratamiento de las muestras clínicas consta de tres etapas: homogeneización, descontaminación y concentración (7,10). Existen numerosos protocolos de homogeneización-descontaminación. Uno de los más difundidos es el método de Kubica, que utiliza la N-acetil-L-cisteína (NALC) como fluidificante y el hidróxido sódico (NaOH) al 2% como descontaminante (7,10). Es el recomendado para la mayoría de los sistemas automatizados de cultivo con medios líquidos.

1.7.2.3.2 Medios de cultivo

Como ya se ha explicado en el apartado 1.2, las micobacterias suelen ser bastante exigentes y requieren medios ricos y frescos. Los medios disponibles para la recuperación de micobacterias incluyen medios tanto no selectivos como selectivos. Estos últimos se diferencian de los primeros en que contienen antimicrobianos para prevenir el crecimiento excesivo de microorganismos contaminantes.

Los medios no selectivos pueden ser sólidos o líquidos. Entre los sólidos, existen dos tipos, los que contienen huevo y los que llevan agar. Los medios sólidos con huevo son medios ricos. Se caracterizan por su buena recuperación de especies micobacterianas y por su capacidad para inhibir la microbiota contaminante debido a que contienen verde de malaquita. Además, permiten neutralizar múltiples productos tóxicos tanto de las muestras clínicas, como de algunos restos de los productos empleados durante la descontaminación. El medio más utilizado es el Löwenstein-Jensen, aunque existen otros como el

Introducción

Petragnani y Coletsos (7,10). Los medios sólidos con agar son transparentes, permitiendo una detección más rápida del crecimiento micobacteriano (10-12 días) comparado con los anteriores. Los más usados son el 7H10 y 7H11 de Middlebrook (7,10).

Los medios líquidos están muy enriquecidos, por lo que recuperan un mayor número de micobacterias en menos tiempo que los medios sólidos (7,10). Esto permite un rápido aislamiento inicial de micobacterias, importante para la toma de decisiones clínicas. El más empleado es el 7H9 de Middlebrook, aunque existen otros como el Dubos, Youmans y Proskauer-Beck (7,10). Estos medios se utilizan como base para diversas pruebas de identificación bioquímica, así como para pruebas de sensibilidad frente a los antimicrobianos (7,10). En cambio, presentan la desventaja de no poder visualizar la morfología de la colonia ni valorar la posible existencia de cultivos mixtos (7,10). Actualmente, estos medios son fundamentales puesto que son la base de los sistemas automatizados no radiométricos de incubación y lectura (7,10,71). Un ejemplo es el Mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT), basado en el 7H9 de Middlebrook que presenta como indicador un componente fluorescente (pentahidrato de rutenio) embebido en silicona. La detección del crecimiento se evidencia por la fluorescencia emitida por dicho compuesto ante la depleción de oxígeno generada por el microorganismo durante su crecimiento, al exponerlo a la luz ultravioleta. Estos sistemas automatizados, como el BACTEC™ MGIT™ 960, permiten además el estudio de la sensibilidad *in vitro* del MTBC frente a los antimicobacterianos de primera línea (7,10). Un aspecto a tener en cuenta con el MGIT™ es que sólo admite el método de descontaminación del NaOH-NALC (7,10). Y su principal inconveniente es que no puede utilizarse para el cultivo de muestras hemáticas (7,10), por lo que en dichos casos se debe proceder como se ha expuesto en el apartado 1.7.2.1.

En general, debido a las características expuestas, se aconseja incluir al menos un medio líquido y uno sólido para el aislamiento primario de muestras clínicas (7,10,71,73).

1.7.2.3.3 Condiciones de incubación

Para el aislamiento del MTBC los cultivos se debe incubar a una temperatura de 35-37°C (7,10,71,73) durante un periodo de 6 a 12 semanas (73). En los medios sólidos la incubación con un 5-10% de CO₂ mejora el crecimiento.

1.7.2.3.4 Identificación

Una vez se aísla por cultivo una cepa su caracterización se puede llevar a cabo mediante distintas metodologías. Las más relevantes se exponen a continuación.

- **Microscopía.** Permite detectar posibles contaminaciones e identificar presuntamente cepas pertenecientes al complejo MTB (73), como se ha explicado en el apartado 1.7.2.2.

- **Morfología de las colonias.** Puede orientar en la identificación de la mayoría de las especies del MTBC. Las colonias rugosas, no pigmentadas, de crecimiento lento y con aspecto de migas de pan (crecimiento eugónico) suele ser característica de *M. tuberculosis* (73).
- **Pruebas bioquímicas.** Antiguamente eran las más utilizadas, pero en la actualidad están siendo sustituidas por técnicas inmunocromatográficas y de biología molecular. La identificación bioquímica no puede establecerse con una única prueba, por muy específica que parezca, sino basándose en los resultados coherentes de un conjunto de ellas (73).
- **Pruebas inmunocromatográficas.** Permiten la detección cualitativa del MTBC a partir de cultivos positivos, tanto en medios sólidos como líquidos (73-77). Estas técnicas se suelen emplear una vez comprobada la AAR de la cepa aislada, permitiendo identificar rápidamente si se trata del MTBC o de una MNT. Se fundamentan en la detección del antígeno MPT64 (también denominado MPB64), una proteína micobacteriana que es secretada específicamente por el MTBC durante el cultivo (73-77). La metodología empleada por estas técnicas se basa en principios inmunocromatográficos, en los cuales los anticuerpos marcados con partículas coloidales reaccionan con los antígenos diana para formar un complejo de antígeno-anticuerpo migratorio, que es capturado por un segundo anticuerpo fijo. Cuando el antígeno diana está presente se produce una reacción de color por acúmulo de dicho complejo en la zona donde está fijado el anticuerpo secundario. Se ha demostrado que estas pruebas presentan una alta sensibilidad (> 95%) y especificidad (> 95%) en varios estudios realizados en entornos clínicos. No obstante, se han descrito casos de falsos negativos en algunas cepas del MTBC (73-77). El motivo de ello es la ausencia del antígeno MPT64 en el medio de cultivo, comprobado por la detección de una mutación en el gen *mpb64* que codifica MPT64 (76,78). Este hecho se ha descrito en algunas cepas de *M. bovis* BCG. En la actualidad existen comercializadas distintas técnicas basadas en esta metodología.
- **Identificación molecular.** Véase el apartado 1.7.2.4 Técnicas moleculares.
- **Proteómica.** En la actualidad, otra de las metodologías empleadas para la identificación micobacteriana es el estudio proteómico mediante el MALDI-TOF MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*). Mediante esta tecnología se puede identificar el MTBC, pero aún no es capaz de discernir entre las diferentes especies que lo componen (79,80). Precisa de cultivos muy bien crecidos, sobre todo cuando se emplean medios líquidos. Sin embargo, su interés se ha focalizado en la identificación de MNT. Es un método rápido, sencillo y económico.

1.7.2.4 Técnicas moleculares

Estas técnicas se basan en la amplificación de fragmentos genéticos específicos del MTBC. Se pueden aplicar tanto a muestra directa como a cepas aisladas mediante cultivo (10,71,73). En ambos casos, suponen una reducción

Introducción

del tiempo de diagnóstico microbiológico, clave para un inicio precoz del tratamiento y para adoptar medidas que eviten la transmisión de la enfermedad. En cuanto a la identificación de las cepas aisladas por cultivo, las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN) han desplazado en gran medida a los métodos clásicos (73).

Las TAAN están diseñadas para dirigirse específicamente al ADN genómico del MTBC o al ARN celular, como por ejemplo el ARNr 16S (73). La mayoría de ellos se basan en la detección de la secuencia de inserción (IS) 6110 (71). El rendimiento de esta secuencia ha sido superior a otras dianas propuestas y está presente en el MTBC entre 0 y 30 copias dependiendo de la especie (71). Pero el hecho de que algunas especies del MTBC carezcan de esta diana, puede suponer un problema (71), aunque no sea frecuente. Debido a ello, en la actualidad las nuevas técnicas moleculares suelen asociar una segunda diana. Esta diana secundaria varía entre técnicas, algunas de las más utilizadas son la IS1081 (81) y el gen codificante del antígeno proteico B (PAB) (82).

Los datos de sensibilidad de las distintas técnicas varían ampliamente en la literatura, pues depende de la diana o las dianas en las que se basa cada técnica. De forma general, la sensibilidad en muestras con baciloscopia positiva oscila entre el 90-100%, mientras que en aquéllas con baciloscopia negativa se sitúa entre el 60-70% (71). En el metaanálisis realizado por Babafemi *et al.* (83) la sensibilidad de las TAAN para el diagnóstico de la TB pulmonar se situó en el 0,82 (0,81-0,83, IC 95%) y la especificidad en el 0,99 (0,99-0,99, IC 95%), con independencia de la baciloscopia.

Por lo que respecta a las formas extrapulmonares, fundamentalmente TB pleural y meníngea, la sensibilidad oscila entre el 50-70% y la especificidad entre el 90-95% (71). La menor sensibilidad obtenida respecto a las formas pulmonares se debe a que las extrapulmonares suelen ser paucibacilares. Aunque falta más evidencia, se piensa que la TB urinaria, peritoneal y pericárdica tendrían una rentabilidad similar (71). Mientras que en el caso de la TB ganglionar y ósea, la sensibilidad sería superior, entorno al 80% (71). Los datos obtenidos por Babafemi *et al.* (83) van en la misma línea, con una sensibilidad del 0,70 (0,67-0,72, IC 95%) y una muy buena especificidad, que se sitúa en el 0,99 (0,99-0,99, IC 95%).

Por consiguiente, los elevados porcentajes de especificidad apoyan el uso de las TAAN para confirmar la enfermedad con un alto grado de certeza, con independencia de su localización (71,73,80,83). Lo que, unido a su rapidez, permiten un inicio precoz del tratamiento específico y contribuyen a un control más eficiente de la enfermedad. En cambio, los datos de sensibilidad obtenidos indican que las TAAN no se deberían utilizar como única prueba para excluir un diagnóstico de TB, sobre todo extrapulmonar, si no que deben apoyarse en los hallazgos clínicos y en el cultivo (71,73,80,83).

Hoy en día, las TAAN también se están empleando para la detección precoz de la existencia de posibles resistencias frente a los antituberculosos de primera línea, sobre todo en zonas con una elevada prevalencia de MDR, permitiendo un mejor ajuste del tratamiento desde el inicio (véase el apartado 1.9.2).

1.8 Diagnóstico de la infección tuberculosa latente

La detección de la infección tuberculosa latente (ITL) mediante técnicas inmunológicas y el estudio de contactos ante un caso de TB, es otra parte importante del Plan Global de la OMS para “Detener la TB” (84). Una vez identificados los casos de ITL y descartada una TB activa se pueden tratar con quimiopprofilaxis, reduciendo significativamente su riesgo de desarrollar la enfermedad (73). Según la OMS la prueba ideal para el diagnóstico de la ITL debe cumplir los siguientes criterios (84): a) alta sensibilidad en todas las poblaciones en riesgo; b) alta especificidad independientemente de la vacunación con BCG o de la infección con micobacterias no tuberculosas; c) fiabilidad y estabilidad en el tiempo; d) resultados establecidos con criterios objetivos, asequibilidad y facilidad en la ejecución; e) capacidad para identificar a individuos recientemente infectados con un mayor riesgo de progresión hacia TB activa.

Actualmente, existen dos metodologías para el diagnóstico de ITL: la prueba cutánea de la tuberculina (TST) y los ensayos de liberación de interferón- γ (IGRA).

1.8.1 Prueba cutánea de la tuberculina (TST)

Introducida por primera vez en 1890, la TST es una inyección intradérmica de un derivado proteico purificado (PPD) (73). Este PPD se obtiene a partir de un filtrado de un cultivo de *M. tuberculosis* esterilizado y concentrado (10). Contiene una mezcla compleja de antígenos, compartidos tanto por el MTBC, incluida la cepa vacunal *M. bovis* BCG, como por la mayoría de MNT (85). El método de referencia es la intradermorreacción de Mantoux, que consiste en la inyección intradérmica de 0,1 ml a la concentración de 2 UT (unidades de tuberculina) del derivado proteico purificado de Seibert (PPD-S) (86) o su equivalente en España, el PPD-RT23 (10,71,86). Mediante esta prueba se mide *in vivo* la reacción de hipersensibilidad retardada basada en el reconocimiento inmunológico de antígenos micobacterianos en individuos expuestos (73). Los antígenos micobacterianos inyectados causan una infiltración de linfocitos antígeno-específicos, con la consiguiente liberación de citoquinas proinflamatorias. La reacción inflamatoria generada da como resultado un área indurada característica en el sitio de la inyección.

Las limitaciones de esta prueba son las siguientes (73): a) es difícil discernir entre la infección real de los efectos de la vacunación con BCG o las infecciones por MNT, de ahí que presente una alta proporción de resultados

falsos positivos y falsos negativos; b) existen problemas técnicos en la administración; c) se genera un refuerzo de la respuesta inmune después de la repetición de la prueba (efecto *booster*); d) la interpretación de los resultados es complicada y subjetiva y e) se requiere de una segunda visita.

1.8.2 Ensayos de liberación de interferón- γ (IGRA)

Debido a las limitaciones inherentes a la prueba de la tuberculina, se han desarrollado diversos inmunoensayos basados en la detección de la secreción de interferón- γ por linfocitos T del paciente, tras una incubación con determinados antígenos tuberculosos (10). El IFN- γ es una citocina fundamental en el control de la infección tuberculosa (apartado 1.5), que se libera como respuesta a la estimulación *in vitro* de las células T sensibilizadas con antígenos específicos de *M. tuberculosis* (71). Actualmente, se emplea para dicha estimulación los antígenos ESAT-6 (*early secretory antigen target* 6) y CFP-10 (*culture filtrate protein* 10), codificados en la región genética RD1. Estos antígenos están presentes en el MTBC, pero no en la vacuna BCG ni en la mayoría de MNT, con la excepción de *M. kansasii*, *M. marinum* y *M. szulgai* (71,73,86). Por consiguiente, estas técnicas permiten discriminar a los individuos infectados por el MTBC de los vacunados por BCG y de los infectados por otras micobacterias, salvo las tres especies indicadas anteriormente. Las principales ventajas respecto a la prueba de la tuberculina son: a) la objetividad de los resultados; b) la posibilidad de repetir la determinación en caso necesario sin que exista un efecto *booster*; c) se elimina la visita de lectura, evitando la posible pérdida de individuos en dicha visita; d) son fáciles de estandarizar y aplicar en el laboratorio; e) permiten la inclusión de controles positivos para detectar a los pacientes anérgicos y f) se respeta la intimidad del individuo (71). El principal inconveniente de estas técnicas es su mayor coste económico (71).

Actualmente, con la creciente evidencia, muchas de las guías nacionales para el diagnóstico de ITL incluyen a los IGRA, aunque la mayoría de los países continúan recomendando y utilizando la TST (73). Denkinger *et al.* (87) realizó una revisión de 33 de estas guías, así como documentos de posicionamiento de 25 países y dos organizaciones internacionales, demostrando una gran diversidad en cuanto al enfoque que se le da a esta técnica. Para simplificar las distintas estrategias estudiadas, Denkinger *et al.* (87) las encuadran en cuatro formas de proceder, que se son: a) el abordaje en dos pasos, primero la TST seguida del IGRA, ya sea cuando el TST es negativa (para aumentar la sensibilidad, principalmente en individuos inmunocomprometidos) o cuando la TST es positiva (para aumentar la especificidad, principalmente en individuos vacunados con BCG); b) TST o IGRA, pero no ambos; c) IGRA y TST conjuntamente (para aumentar la sensibilidad) y d) solo IGRA, reemplazando a la TST. No obstante, en este estudio se recalca que la mayoría de las directrices actuales no utilizan métodos objetivos y transparentes para calificar la evidencia y las recomendaciones.

En general, la evidencia sugiere que la detección de ITL utilizando tanto TST como IGRA, debería limitarse idealmente a aquellos casos en los que existe un riesgo suficientemente alto de progresión hacia la enfermedad y que se beneficiarían de la quimioprofilaxis si la prueba diese un resultado positivo (73,88). El uso clínico de los IGRA en diferentes grupos ha sido revisado en los últimos años y los documentos de posicionamiento han sido publicados por organizaciones internacionales como la OMS y el ECDC (89-92). Por lo general, la OMS recomienda el uso de la TST, pero sólo en entornos con ingresos medios y bajos, independientemente de la infección por el VIH; pero no recomienda el uso de los IGRA. Por otro lado, el ECDC se basa en la incidencia de la TB para la toma de decisiones. Así, en entornos con una alta incidencia, el ECDC sugiere no utilizar los IGRA para diagnosticar ITL, puesto que no suponen un valor añadido. Mientras que, en entornos con una baja incidencia el ECDC sí sugiere una estrategia de dos pasos (73,87,91).

Según la OMS, aunque los IGRA pueden identificar tanto infección tuberculosa latente como activa, estos ensayos no están concebidos como una herramienta de diagnóstico indirecto para la TB activa (89). El posicionamiento del ECDC a este respecto es similar, sugiriendo que para el diagnóstico de la TB activa los IGRA no deben reemplazar a los métodos convencionales de diagnóstico y, en general, no suponen un valor añadido en la mayoría de las situaciones clínicas, cuando se combinan con los métodos convencionales. No obstante, en determinadas situaciones clínicas como, por ejemplo: pacientes con TB extrapulmonar, pacientes con BAAR negativo en esputo y/o cultivo negativo, diagnóstico de TB en niños o diagnóstico diferencial de la infección por MNT, el ECDC sugiere que los IGRA podrían aportar información complementaria como parte del proceso diagnóstico.

1.9 Estudio de la sensibilidad del MTBC frente a los fármacos antituberculosos

La principal causa de resistencia en el MTBC es la acumulación de mutaciones cromosómicas puntuales, inserciones y deleciones (indels) en los genes que codifican las dianas de los fármacos o bien en las enzimas que los activan (93). Se acepta que dichas mutaciones pueden surgir espontáneamente tanto con exposición previa al tratamiento como sin ella (10).

Los estudios de Canetti, Rist y Grosset (94) establecieron la frecuencia de mutaciones espontáneas asociadas a cada fármaco antituberculoso de primera línea. Así, en presencia de isoniacida, etambutol y estreptomina aparecía una cepa mutante resistente cada 10^5 - 10^7 bacterias; con rifampicina cada 10^7 - 10^9 y con pirazinamida cada 10^2 - 10^4 . La frecuencia teórica de cepas mutantes resistentes a más de un fármaco fue calculada como la suma exponencial de las frecuencias individuales de cada uno. Del mismo modo, se estimaron los tamaños de las poblaciones bacterianas presentes en las lesiones, observando que la población micobacteriana podía variar desde 10^3 - 10^5 bacterias en infiltrados de poca extensión hasta 10^7 - 10^9 en cavidades. Como consecuencia de ello, se dedujo que es extremadamente improbable generar

Introducción

una mutación simultánea a más de dos fármacos (10). Por ello, en los tratamientos actuales se administran cuatro fármacos simultáneamente, hasta reducir drásticamente la población bacteriana (10).

La confirmación definitiva de la resistencia se debe realizar mediante métodos microbiológicos que permitan comprobar la eficacia de cada antituberculoso (10). En TB se considera que una cepa es resistente cuando el 1% o más del inóculo de la población bacteriana en estudio es resistente a una concentración prefijada de un determinado fármaco (94). Dichas concentraciones prefijadas se denominan “concentraciones críticas” y fueron establecidas por consenso internacional para cada fármaco (95). Representan las concentraciones más bajas que inhiben el crecimiento de las “cepas salvajes” (sensibles) del MTBC que nunca han estado expuestas a los mismos, mientras que no inhiben a las cepas procedentes de pacientes que no responden al tratamiento, consideradas resistentes (95).

La realización del estudio de sensibilidad tiene dos finalidades: una individual y otra global. La primera está enfocada a pacientes concretos. Y, la segunda, presenta un enfoque epidemiológico, para conocer la prevalencia de las cepas resistentes circulantes en una población (11). En la actualidad, se recomienda su realización en el primer aislado de todos los pacientes nuevos o previamente tratados y en los casos de sospecha de fracaso terapéutico tras dos o tres meses de tratamiento adecuado (10,71,77,95-97). Además, cuando la TB afecte simultáneamente a más de un órgano, los estudios deberían individualizarse para cada localización, sin presuponer que el resultado vaya a ser siempre coincidente (95). Con todo ello se pretende conocer la respuesta de los aislados clínicos frente a los mismos y ajustar el tratamiento cuando sea necesario (71). En el estudio deberían incluirse todos los fármacos de primera línea (isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol y estreptomina), ya que proporcionan información sobre el esquema terapéutico actualmente recomendado para la mayoría de los pacientes (10,71,77,95-97). Los fármacos de segunda línea deberían ser evaluados en las siguientes situaciones: a) cuando una cepa sea resistente a la isoniazida, rifampicina, etambutol o pirazinamida; b) cuando se detecten mutaciones en genes que codifican resistencia a la isoniazida y/o a la rifampicina mediante técnicas moleculares y c) cuando se disponga de información clínico-epidemiológica que así lo aconseje (10,71,77,95-97). Los antituberculosos de segunda línea son: amikacina, kanamicina, capreomicina, clofazimina, cicloserina, etionamida, ácido paraaminosalicílico (PAS), fluoroquinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino), linezolid y rifabutina (95).

Los métodos empleados para el estudio de la sensibilidad de MTBC frente a los antituberculosos pueden ser fenotípicos o genotípicos.

1.9.1 Métodos fenotípicos

Los métodos fenotípicos se subclasifican a su vez en función del tipo de medio de cultivo empleado.

1.9.1.1 Métodos basados en medios de cultivo sólidos

En la década de 1960, la OMS encargó a un grupo de expertos definir la metodología para la realización de dichos estudios (10). Se propuso el empleo de medios de cultivo sólidos, con concentraciones fijas de antimicrobianos capaces de diferenciar sensibilidad de resistencia (10). Se aceptaron tres métodos: el de Mitchison, el de Meisser y el de Canetti, Rist y Grosset.

El método de Mitchison se basa en la ratio de resistencia o la relación de resistencias. Compara la concentración mínima inhibitoria (CMI) de una determinada cepa con la de una cepa de referencia (10,95).

El método de Meisser se basa en las concentraciones absolutas. Compara el número de colonias en presencia del fármaco, con el número de colonias sin él (10,95).

El método de Canetti, Rist y Grosset (10,94,95) se basa en las proporciones críticas o múltiples. Emplea dos diluciones distintas del inóculo micobacteriano y dos concentraciones de cada antimicrobiano. Compara el número de colonias crecidas en cada una de ellas respecto a las crecidas en un medio sin antibiótico, interpretando el resultado a través de la proporción de colonias capaces de crecer en presencia del fármaco. La resistencia del microorganismo se considera clínicamente significativa cuando la población bacteriana resistente es igual o superior al 1%. Es el más utilizado y la mayoría de los métodos actuales derivan de él (10,77,95,97). Aunque inicialmente la técnica se diseñó con el medio de Löwenstein-Jensen, posteriormente se estandarizó para los medios 7H10 y 7H11 de Middlebrook (10). Los principales inconvenientes de este método son: el período de incubación (3 semanas); el cálculo del inóculo, debido a la tendencia del MTBC a formar agregados no homogéneos; así como otras dificultades técnicas y de bioseguridad.

Un método alternativo, también basado en los medios sólidos, es la epsilometría (E-test). Se basa en una tira con un gradiente de difusión de antimicrobiano que combina los principios de la difusión en disco y la dilución en agar, para el estudio de la sensibilidad *in vitro*. Permite determinar la CMI de los antimicrobianos (95,98,99).

1.9.1.2 Métodos basados en medios de cultivo líquidos

Los métodos basados en medios de cultivo líquido son la opción más utilizada en la actualidad (10,95,99). Sus principales ventajas frente a los cultivos sólidos son un menor tiempo de incubación (7-14 días), la estandarización del inóculo y la lectura automatizada (10,95,99). Inicialmente el método más empleado fue el radiométrico, con el equipo Bactec 460 TB (10,95,99). Pero debido a su principal inconveniente, el empleo de isótopos radiactivos, fue sustituido por los sistemas no radiométricos (95). Hoy en día, son los métodos no radiométricos los más utilizados, entre los que destacan el

Introducción

BACTEC™ MGIT™ 960 (Becton-Dickinson Diagnostics) y VersaTREK® (Thermo Scientific) (10,95,97,100). Ambos sistemas utilizan el medio 7H9 de Middlebrook suplementado y el crecimiento se evidencia mediante la detección del oxígeno consumido (10,95,99). Estos sistemas se evaluaron comparativamente respecto al método de referencia de las proporciones en agar y están avalados por el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) para las pruebas de sensibilidad en el MTBC frente a los antituberculosos de primera línea (95). Las concentraciones críticas iniciales que se analizan vienen predeterminadas por el fabricante para los fármacos de primera línea, establecidas como equivalentes de las utilizadas en el método de las proporciones (95). En general, con la isoniazida y la rifampicina no suele haber problemas, pero con la estreptomycinina, el etambutol y la pirazinamida sí existen algunas discrepancias entre laboratorios (95).

Un caso especial es el de la pirazinamida. Este antituberculoso es un profármaco que se activa mediante una enzima micobacteriana denominada pirazinamidasa, transformándola en el ácido pirazinoico (POA), que es el metabolito activo (10,101,102). El POA requiere de un medio ácido (pH 5,5) para ser efectivo, por lo que el pH del medio de cultivo debe adecuarse a dichas condiciones. Sin embargo, aproximadamente un 10% de los aislamientos del MTBC no crecen bien a ese pH (10,95). Para salvar este problema el estudio *in vitro* de la sensibilidad a PZA en medio líquido se lleva a cabo a pH 6 y con una mayor concentración de antimicrobiano (10).

Por otro lado, también es posible analizar concentraciones críticas de fármacos de segunda línea. No obstante, no siempre existe consenso para los puntos de corte de dichos fármacos ni para la metodología a emplear (10,95).

Una alternativa a los métodos automatizados es la microdilución en caldo, permitiendo determinar la CMI frente a múltiples fármacos (95). Actualmente, existe un producto comercial (*MYCOTB sensititre® plates*, TREK Diagnostics) que incluye fármacos de primera línea (isoniacida, rifampicina, etambutol y estreptomycinina) y de segunda línea (amikacina, kanamicina, rifabutina, ofloxacino, moxifloxacino, etionamida, cicloserina y PAS) de manera simultánea (95,103-105). Aunque para el MTBC no se considera el método de referencia, se trata de un método sencillo y económico, cuya mayor dificultad reside en la lectura e interpretación, debido al crecimiento no homogéneo de estos microorganismos (95). Con el fin de evitar este inconveniente, se ha diseñado un método indirecto que permite una lectura basada en el cambio de color del medio de cultivo debido a una reacción redox de un compuesto, la resazurina, añadida al medio. Este compuesto cambia de color de azul (estado oxidado) a rosa (estado reducido) cuando se produce crecimiento micobacteriano. A este método se le denomina prueba de microtitulación con resazurina (*resazurin microtiter assay*, REMA) (95).

1.9.1.3 Métodos de sensibilidad alternativos

Además de los métodos convencionales, se han diseñado otros métodos fenotípicos con la intención de determinar la resistencia a los fármacos de una forma más rápida, sencilla y económica. A continuación, se resumen brevemente los más destacados.

Métodos basados en micobacteriófagos. Consisten en añadir micobacteriófagos a un cultivo de micobacterias en presencia del antimicrobiano objeto de estudio. Estos infectarán únicamente a las micobacterias viables, que serán las resistentes. Se han aplicado en estudios de sensibilidad a isoniazida y rifampicina, pero presentan problemas de sensibilidad, especificidad y una alta tasa de contaminaciones (95).

Citometría de flujo. Permite la detección de micobacterias viables mediante el uso de colorantes de ácidos nucleicos permeables a nivel celular. Se compara la fluorescencia de las cepas crecidas en medios con antibiótico respecto a los controles. Uno de sus inconvenientes es el elevado coste de los equipos (95).

Prueba de la nitrato reductasa. Se basa en la capacidad del MTBC para reducir los nitratos a nitritos. Se utiliza el medio de Löwenstein-Jensen al que se le incorpora KNO_3 con y sin fármacos (95).

Observación microscópica de la sensibilidad a los fármacos (*microscopic-observation drug-susceptibility*, MODS). Se basa en la detección precoz del *cord factor* que exhibe el MTBC, con la ayuda de un microscopio de luz invertida (95).

1.9.2 Métodos genotípicos

El estudio de sensibilidad del MTBC es fundamental para establecer un tratamiento adecuado, pero los resultados de las pruebas de sensibilidad *in vitro* fenotípicas o convencionales suelen requerir varias semanas, suponiendo un retraso crucial desde un punto de vista asistencial (71,95,99). La detección molecular de la resistencia evita en gran medida este problema, ofreciendo resultados rápidos y útiles, ya sea para validar el tratamiento empírico inicial o para orientar el esquema terapéutico en función del patrón de resistencia detectado (95).

Los métodos genotípicos se basan en la detección de alteraciones en genes relacionados con la resistencia a los antituberculosos, como se muestra en el siguiente apartado. No obstante, en algunos casos la resistencia también puede estar originada por cambios epigenéticos en la expresión génica y en la modificación proteica, que no serían detectables mediante esta metodología (106). También cabe destacar, que en ocasiones la causa de la resistencia se desconoce. Este hecho ocurre en un porcentaje variable de casos dependiendo del fármaco (95). Por estas dos razones, en el momento actual, los métodos genotípicos todavía se deben emplear como un apoyo a los estudios de

Introducción

sensibilidad convencionales, los cuales continúan siendo el método de referencia (73).

Se han desarrollado tanto técnicas caseras como comerciales. Aunque hoy en día existe un consenso sobre la priorización del uso de métodos comerciales, con el fin de facilitar su estandarización, la aplicación de controles de calidad y poder realizar comparaciones entre las distintas técnicas comercializadas (95). Existen en la actualidad multitud de técnicas moleculares y otras que están en desarrollo, la mayoría de las cuales se describen en las siguientes referencias bibliográficas (95,99,100,107).

Además, la introducción de nuevas herramientas, como la secuenciación de genoma completo (WGS - *Whole Genome Sequencing*) mediante la secuenciación de alto rendimiento (NGS - *Next Generation Sequencing*), empieza a estar teniendo un impacto muy significativo en la mejora del diagnóstico de TB MDR y XDR (101,107-111). También contribuye a ampliar el conocimiento sobre los mecanismos emergentes de resistencia a los fármacos y permitir que la epidemiología molecular se realice a un nivel sin precedentes en comparación con los métodos convencionales (107,112-115).

1.9.2.1 *Mecanismos de resistencia*

Las micobacterias presentan una resistencia natural a diversos antimicrobianos, debido a diversos factores como: la baja permeabilidad de su pared celular, la producción de enzimas degradantes (β -lactamasas) o modificantes (acetiltransferasas) y por la expresión de bombas de expulsión activa (95). Actualmente, se sabe que la resistencia frente a los fármacos empleados para el tratamiento de la TB se debe fundamentalmente a mutaciones cromosómicas espontáneas en los genes que codifican la diana del fármaco o las enzimas implicadas en su activación (10,93,95,106). Estas mutaciones pueden surgir sin exposición previa al tratamiento o tras una presión antibiótica en el curso de un tratamiento inadecuado (10,95). Las cepas que presentan resistencia a múltiples fármacos se deben a una acumulación secuencial de mutaciones en diferentes genes (93,95,106). Muchas de estas mutaciones y su correlación con la resistencia a los diversos fármacos en el MTBC están bien establecidas y explican una gran parte del conjunto de resistencias fenotípicas observadas. En el Apéndice I se muestra un resumen de los genes implicados en la resistencia a los antituberculosos.

1.10 Tratamiento de la tuberculosis

Todo tratamiento de la TB debe cumplir dos premisas: asociar fármacos para evitar la selección de resistencias y prolongar la duración del tratamiento lo suficiente para asegurar la curación y evitar las recaídas (116-118).

Los fármacos empleados para el tratamiento de la TB se dividen en dos grupos: los denominados de primera línea y los de segunda línea. Dentro de los de primera línea se incluyen los utilizados de primera elección: isoniazida

(INH), rifampicina (RMP), etambutol (EMB) y pirazinamida (PZA) (71,97,118-120), los cuales forman parte del grupo 1 (118), como se muestra en la Tabla 3. Estos a su vez se diferencian en fármacos denominados “esenciales” o “acompañantes”. Los fármacos “esenciales” pueden ser bactericidas, como INH y RMP, o esterilizantes (con capacidad de eliminar los bacilos en fases semilantes), como son RMP y PZA (118). Por otro lado, los “acompañantes” previenen la aparición de resistencias, como es el caso de EMB (118). Por razones históricas, la estreptomina (SM) también se considera de primera línea, pero se engloba en el grupo 3 junto con el resto de agentes inyectables de segunda línea (118).

Los fármacos de segunda línea se subclasifican en cuatro grupos con el fin de facilitar el establecimiento de pautas de tratamiento (118). El grupo 2 lo forman las fluoroquinolonas (FQ): levofloxacin y moxifloxacin (Tabla 3), que son fármacos “esenciales” con actividad bactericida y esterilizante (117,118,121). El grupo 3 está formado por los inyectables de segunda línea: estreptomina, kanamicina, amikacina y capreomicina (Tabla 3). Presentan actividad bactericida, pero con escasa o nula actividad esterilizante y son más tóxicos que las FQ (117,118,121). El grupo 4 está integrado por un grupo heterogéneo de fármacos (Tabla 3), unos con actividad bactericida y esterilizante (linezolid, bedaquilina y delamanid), otros con una buena actividad esterilizante (clofazimina) y otros que se comportan como “acompañantes” (etionamida/protionamida y cicloserina/terizidona). Los fármacos de este grupo podrían darse conjuntamente pues sus dianas terapéuticas son diferentes (117,118,121,122). Finalmente el grupo 5, donde quedarían los carbapenems (imipenem o meropenem) asociados a ácido clavulánico, probablemente bastante activos, pero aún con poca evidencia; el ácido paraaminosalicílico (PAS), muy poco eficaz y muy mal tolerado a nivel gástrico y la tioacetazona (118).

Tabla 3. Clasificación de los fármacos antituberculosos a la hora de diseñar un esquema terapéutico contra la TB.

Fuente: Caminero *et al.* (118).

Grupo	Fármacos
1	Isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida
2	Levofloxacin y moxifloxacin
3	Estreptomina, kanamicina, amikacina y capreomicina
4	Clofazimina, etionamida/protionamida, cicloserina/terizidona, linezolid, bedaquilina y delamanid
5	Carbapenems (imipenem o meropenem) + ácido clavulánico, ácido paraaminosalicílico y tioacetazona

1.10.1 Régimen estándar

El tratamiento actual de los casos nuevos de TB (TB inicial, nunca tratados) se rige por las bases bacteriológicas y por los numerosos ensayos terapéuticos controlados realizados durante más de cuarenta años por diversas sociedades científicas y organizaciones sanitarias internacionales

Introducción

(71,97,99,119). La guía de tratamiento para estos casos se resume en la Tabla 4.

Tabla 4. Tratamientos de inicio de la TB.

Abreviaturas: E - etambutol; H - isoniácida; R - rifampicina; S - estreptomicina y Z - pirazinamida. Fuente: González-Martín *et al.* (54,71,118).

Situación clínica	Pauta
TB pulmonar y extrapulmonar	2HRZE ^{1,2,3} /4HR ⁴
Tratamientos iniciales alternativos	2HRZS/4HR 2HRE/7HR
Situaciones especiales (gota y hepatopatía crónica grave)	2HRE/7HR
Meningitis y tuberculomas	2HRZE/10HR
Silicosis y espondilitis TB con afección neurológica	2HRZE/7HR

¹Cuando el antibiograma es sensible a todos los fármacos se podría retirar E.

²Si no es posible utilizar E, puede sustituirse por S (2HRZS/4HR).

³No cambiar a la fase de continuación (4HR) hasta que no se dé una de las siguientes circunstancias: que la baciloscopia sea negativa o que se sepa que existe sensibilidad a H y R.

⁴Si la negativización de las baciloscopias y/o cultivos se demora por encima de los dos meses se debe prolongar el tratamiento por encima de los seis meses, con un mínimo de cuatro después de que se negativicen los cultivos.

Los esquemas de tratamiento recomendados universalmente y que reúnen todos los requisitos favorables son los de seis meses de duración: dos meses con RMP, INH, PZA y EMB, seguidos de cuatro meses con INH y RMP (71,97,99,119). Si se dispone de la sensibilidad a estos fármacos se puede retirar EMB (71,97,99,119). Además, para facilitar la adherencia al tratamiento, se recomienda utilizar siempre los preparados farmacológicos en combinación fija (54,71,120). En la actualidad, se dispone de preparados con cuatro (INH, RMP, PZA y EMB), tres (INH, RMP y PZA) y dos fármacos (INH y RMP).

1.10.2 Situaciones especiales

1.10.2.1 Pacientes pediátricos

Su tratamiento debe ser igual que en los adultos ajustando las dosis al peso (54,71). Sin embargo, en menores de 4 años, durante la fase inicial se recomienda sustituir el EMB por etionamida o por un aminoglucósido. Esto es debido a que en estos pacientes no es posible valorar la evolución de su agudeza visual ni de su capacidad para discriminar los colores (54).

1.10.2.2 Embarazo y lactancia

Se emplea el régimen estándar. Debe evitarse el uso de aminoglucósidos y protionamida (54,71).

1.10.2.3 *Hepatopatía crónica*

Inicialmente, se debe intentar el tratamiento con un régimen estándar, realizando una estrecha vigilancia clínica y analítica de la función hepática. En casos de hepatopatía avanzada, se optará por la retirada de uno de los tres fármacos con potencial efecto hepatotóxico (INH, RMP o PZA), preferiblemente PZA, procurando mantener la RMP (Tabla 4). Sólo en casos de hepatitis aguda o fases terminales de hepatopatía crónica se optará por un tratamiento sin fármacos hepatotóxicos. En estos casos se incluirá una fluoroquinolona, un inyectable (aminoglucósido o capreomicina) y EMB o cicloserina. La duración del tratamiento deberá ajustarse a la pauta utilizada (54,71).

1.10.2.4 *Insuficiencia renal crónica*

Se emplea el tratamiento estándar. Pero en pacientes con aclaramiento de creatinina inferior a 30 ml/min o en pacientes en programas de hemodiálisis se recomienda administrar el tratamiento tres veces por semana (siempre después de la hemodiálisis) manteniendo las mismas dosis de la pauta diaria (71).

1.10.2.5 *Formas extrapulmonares*

Se emplea el régimen estándar (54,71). No obstante, en la meningitis tuberculosa y en la espondilitis tuberculosa con afectación neurológica se debe prolongar la duración del tratamiento (Tabla 4) (54,71).

1.10.2.6 *Silicosis*

Se emplea el tratamiento estándar, pero durante más tiempo (Tabla 4) (71).

1.10.2.7 *Administración de corticoides*

Están indicados en las primeras semanas de tratamiento de las formas meníngeas y en la pericarditis (54,71,120).

1.10.2.8 *Administración de piridoxina*

El uso de INH puede producir neuropatía periférica por déficit de piridoxina (vitamina B6) en ciertas situaciones. Por tanto, es recomendable la administración profiláctica de suplementos de piridoxina en pacientes alcohólicos, desnutridos, embarazadas, lactantes, diabéticos, en pacientes con insuficiencia renal, con edad avanzada y en coinfectados por el VIH (54,71).

1.10.2.9 *Coinfección por el VIH*

En pacientes en los que el tratamiento antirretroviral (TAR) está ya instaurado, se pueden tratar con la pauta estándar de tratamiento durante 6 meses (54,71,120). No obstante, se debe tener en cuenta que la RMP es un potente inductor del citocromo P450 y acelera el metabolismo de muchos de

Introducción

los fármacos antirretrovirales, disminuyendo significativamente sus valores plasmáticos. Debido a ello, la RMP no puede coadministrarse con los inhibidores de la proteasa (71). Por tanto, si el paciente recibe inhibidores de la proteasa (IP) existen dos opciones. La primera consiste en adaptar el TAR a una pauta compatible con el uso de RMP, con el empleo de dos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos y como tercer fármaco efavirenz, raltegravir o dolutegravir (54,123). En el caso excepcional de que un IP fuese la única opción para el TAR, la segunda opción sería sustituir RMP por rifabutinina y realizar el correspondiente ajuste en las dosis de los fármacos (123).

Si el paciente no estaba recibiendo terapia antirretroviral (TAR), el tratamiento de la TB se debe iniciar primero y tan pronto como sea posible se administrará el TAR, dentro de las primeras ocho semanas de tratamiento (120). Los pacientes VIH positivos con inmunosupresión profunda (recuentos de CD4 inferiores a 50 células/ μ l) deben recibir el TAR en las primeras dos semanas desde el inicio del tratamiento antituberculoso (120), con la excepción de la meningitis tuberculosa, en la cual se debe esperar varias semanas para iniciar el TAR, pero dentro de las ocho semanas (123). El comienzo del TAR puede ocasionar un empeoramiento paradójico transitorio con fiebre, aumento del infiltrado y/o de las adenopatías, denominado síndrome inflamatorio de reconstitución inmune (SIRI) (54,120).

1.10.2.10 Resistencia, alergia, intolerancia, toxicidad o interacciones

En los casos en que se precise de un cambio del régimen estándar de tratamiento, se debe seguir estrictamente la norma de mantener al menos una pauta de tres fármacos activos durante la fase inicial del tratamiento y dos en la fase de continuación, evitando la monoterapia que podría provocar una selección de cepas resistentes (71). Es fundamental disponer de un antibiograma adecuado que oriente la elección de los fármacos a elegir.

Para los casos de mono/polirresistencia a INH o RMP, así como casos de TB MDR y XDR véase la Tabla 5.

Tabla 5. Esquemas básicos recomendados para los pacientes con mono/polirresistencia a isoniazida o rifampicina, TB MDR y TB XDR.

Abreviaturas: Am - amikacina; Cfz - clofazimina; Cm - capreomicina; Cs - cicloserina; E - etambutol; Eth - etionamida; H - isoniácida; Lfx - levofloxacino; Mfx - moxifloxacino; Pth - protionamida; R - rifampicina; S - estreptomicina y Z - pirazinamida. Fuente: Caminero *et al.* (118).

Situaciones	Pautas
Resistente a H (mono o polirresistencia) y sensible a R	9 H ¹ RZE 2 FQ ² -REZ / 7 FQ ² -RE 2 RZE / 10 RE
Resistente a R (mono o polirresistencia) y sensible a H o sensibilidad a H desconocida	Mismo tratamiento que la TB MDR, añadiendo H al régimen, pero sin contarla entre los 4 fármacos nuevos
TB MDR, pero sin resistencia a fármacos de segunda línea	Esquema acortado: 4 ³ (Cm/Am+Mfx ⁴ +Pth/Eth+Cfz+E+Z+H ¹) / 5 (Mfx ⁴ +Cfz+E+Z)
	Esquema convencional: Fase intensiva ⁵ (Cm ⁶ +Mfx/Lfx+Z+ 2 fármacos del grupo 4 ⁷) / Fase continuación ⁸ (Mfx/Lfx+Z+2 fármacos del grupo 4 ⁷)
Patrones más amplios de TB MDR y TB XDR	Consultar con expertos. Mínimo 4 fármacos nuevos siguiendo la clasificación expuesta (grupos 1 a 5) y tratando de que el esquema lleve el máximo número de medicamentos bactericidas y esterilizantes.

¹Dosis altas de H.

²La FQ (Lfx/Mfx) solo se debe introducir en el régimen si se administra desde un inicio con el resto de los fármacos. No se debe añadir si el resultado de resistencia a la H se recibe después de 3-4 semanas de tratamiento, por el posible riesgo de realizar una monoterapia encubierta. En ese caso utilizar 9 HRZE.

³Mínimo 4 meses o hasta la negativización de las baciloscopias.

⁴Altas dosis de Mfx.

⁵Fase intensiva: hasta la negativización de los cultivos o hasta 6 meses si existen lesiones extensas. Mantener un mínimo de 4 meses si el paciente no expectora y no se pueden realizar exámenes de esputo de control.

⁶El inyectable puede pasar a darse tres veces por semana (con un intervalo de 48 horas entre cada dosis) cuando se produce la negativización de las baciloscopias.

⁷Los 2 fármacos del grupo 4 se escogerán en función de disponibilidad y posibles efectos adversos.

⁸Fase continuación: hasta completar 21 meses de tratamiento.

1.10.3 Control del tratamiento

Previamente a la instauración del tratamiento antituberculoso es necesario realizar un hemograma, determinar las enzimas hepáticas, bilirrubina, creatinina, ácido úrico y conocer el estado serológico respecto al VIH, VHB y VHC (54). En caso de pautar un tratamiento prolongado con EMB, se debe examinar la agudeza visual y la capacidad de percepción de los colores (54). Durante el tratamiento se deben realizar cultivos de esputo a

Introducción

intervalos de tres o cuatro semanas hasta obtener dos muestras consecutivas negativas. El cultivo suele negativizarse tras cuatro o cinco semanas de tratamiento. No obstante, si a partir del tercer mes de tratamiento el cultivo del esputo persiste positivo, se debe repetir el antibiograma (54). Se debe valorar mensualmente la adherencia al tratamiento, la evolución clínica y los efectos secundarios de la medicación. A los dos meses y al final del tratamiento se realizará una radiografía de tórax (54).

En pacientes de especial riesgo de abandono precoz del tratamiento y en los casos en que se sospeche la posibilidad de incumplimiento, es necesario aplicar un sistema de tratamiento directamente observado (TDO) (71).

1.10.4 Tratamiento preventivo de la infección tuberculosa

El estudio de la infección tuberculosa latente (ITL) se debe realizar con el fin de iniciar el tratamiento en los casos en que mejor se ha demostrado su efectividad (124): a) infección reciente (contactos infectados y personas que presentan una conversión de la TST); b) infección por el VIH; c) lesiones residuales en la radiografía de tórax sin tratamiento previo, y d) pacientes infectados que han de iniciar tratamiento con fármacos anti-TNF α o candidatos a trasplante. En el caso de los contactos íntimos y frecuentes con TST negativa, la prueba debe repetirse a las 8-12 semanas y sólo se indicará tratamiento si existe conversión de la TST (71). Por otro lado, la quimioprofilaxis primaria (tratamiento preventivo de personas no infectadas) está indicada solamente en los casos en que los contactos sean niños, adolescentes, personas infectadas por el VIH o inmunodeprimidos. Debido a que estos grupos presentan un mayor riesgo de desarrollar una TB grave (71). En estos casos, la TST también se debe repetir a las 8-12 semanas y si se positiviza se continua con el tratamiento; mientras que si sigue siendo negativa se retira, salvo que se sospeche de un posible falso negativo de la tuberculina (por ejemplo, en VIH e inmunodepresión profunda) (125,126).

Es fundamental descartar la enfermedad TB antes de iniciar el tratamiento frente a la ITL (54,71). El fármaco más estudiado y con eficacia demostrada frente a la ITL es la INH (124). La monoterapia con INH durante seis meses es la pauta recomendada por la OMS para adultos y niños, independientemente de la incidencia de TB (92,127). Las alternativas a esta pauta son: a) nueve meses o más de INH; b) RMP cuatro meses; c) RMP más INH diarias durante tres meses o d) rifapentina más INH semanales durante tres meses (54,71,92,127).

1.11 Investigación de casos relacionados con transmisión de TB

1.11.1 Epidemiología clásica

Debido a la importancia de la TB se han establecido programas de control con el fin de cortar la transmisión de este microorganismo y reducir el riesgo de exposición al resto de miembros de la comunidad, disminuyendo así la

incidencia de la enfermedad y con el tiempo también su prevalencia (128). En dichos programas de control se establece que ante un caso de TB, los servicios de Salud Pública deben realizar un estudio de contactos del mismo para determinar la existencia de otros casos infectados como consecuencia del contagio a partir del caso índice (71,126,129). Esto es más factible en países con recursos sanitarios adecuados, entre los que se encuentra España.

El estudio de contactos es prioritario en los casos de TB pulmonar con cultivo de esputo positivo y, sobre todo, con baciloscopia positiva. También se deben estudiar los contactos de los menores de 15 años con TST positiva y los contactos de los conversores recientes en busca de la fuente de infección (129). El estudio de contactos no se lleva a cabo sólo a nivel familiar sino también en el ámbito extrafamiliar del caso, siguiendo el esquema de los círculos concéntricos (128,129). Este esquema permite establecer prioridades según la probabilidad de infección de TB (véase la Tabla 6).

Tabla 6. Prioridades en el estudio de contactos.

Fuente: Plan para la prevención y control de la tuberculosis en España, 2016 (129).

Prioridad	Contactos
Alta	Personas con contacto estrecho o prolongado (> 6 horas al día)
	Niños < 5 años
	Personas con alteración del sistema inmunitario
Media	Personas con contacto diario, pero < 6 horas
Baja	Contacto esporádico (no diario)

El estudio de contactos se debe iniciar lo antes posible, aprovechando el impacto que produce el diagnóstico de la TB (129). A los contactos considerados de alta prioridad se les realizará la TST y/o IGRA, así como una radiografía de tórax. Estas pruebas pueden ser realizadas también al resto de contactos según la prioridad establecida o si el número de conversiones detectadas entre los convivientes supera el porcentaje previsto (71,126). En el caso de que la TST/IGRA inicial fuese negativa, se repetirá a las 8-12 semanas para detectar contagios que en el primer estudio todavía no hubiesen convertido.

La coordinación entre los centros implicados en el estudio de contactos, los equipos sanitarios que realizan el diagnóstico de TB y los laboratorios de microbiología es fundamental para conseguir el control de esta enfermedad (129).

1.11.2 Epidemiología molecular

La epidemiología molecular tiene como finalidad comparar secuencias de ácidos nucleicos de dos o más cepas, para poder establecer si están o no relacionadas entre sí (130). En epidemiología, al grupo de cepas relacionadas por el hecho de descender de un ancestro común más o menos lejano, se le denomina clon o grupo clonal (130). La definición de clon es probabilística y el nivel de similitud necesario para su definición debe considerar el taxón

Introducción

estudiado, el marcador genético utilizado y el tiempo que abarque la investigación epidemiológica (130). En el caso concreto del MTBC, se debe tener en cuenta que este complejo presenta una diversidad genética sorprendentemente baja, consecuencia de un escaso intercambio genético horizontal y de una estructura poblacional mayoritariamente clonal (131,132). Sin embargo, aunque pequeña, sí existe variación genética en la población del MTBC. Ésta puede ser debida a polimorfismos de un único nucleótido (SNP), polimorfismos de secuencia larga (LSP) o polimorfismos de secuencias repetidas (130). La detección de estas variaciones puede realizarse mediante diversos tipos de marcadores. Algunos de los cuales visualizan variaciones que tuvieron lugar en un tiempo más o menos lejano y sirven para clasificar las cepas en “linajes” de interés filogenético. Mientras que otros, detectan variaciones mucho más recientes y permiten tipificar las cepas para identificar posibles cadenas de transmisión (130). Éstas últimas son las más interesantes desde un punto de vista epidemiológico, permitiendo estudiar la transmisión de persona a persona, la identificación temprana de brotes y los grupos de transmisión de alto riesgo (73,129), así como posibles contaminaciones cruzadas de laboratorio (129,133,134). Por ello, en la actualidad, los métodos moleculares respaldan el estudio de contactos rutinario en muchos países (73,129). Por otro lado, a nivel individual, la tipificación molecular también permite discernir entre reinfección y reactivación (135,136).

En general, los métodos moleculares del MTBC y el reconocimiento de familias de genotipos ha facilitado el estudio de la estructura poblacional del MTBC y su dinámica de transmisión (73).

En las últimas dos décadas, han surgido múltiples métodos de tipificación molecular para aislamientos del MTBC, con diferentes niveles de reproducibilidad, poder discriminativo y demandas de experiencia técnica (73). Las técnicas más empleadas se exponen a continuación.

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

Este método ha sido el más utilizado en los últimos veinte años debido a su elevado poder discriminatorio (137). Además, fue el primer método de tipificación de cepas que demostró ser adecuado para el estudio de la transmisión (138). Se basa en el número de secuencias de inserción IS6110 presentes en el genoma de cepas pertenecientes al MTBC, el cual varía de 0 a 30 copias. Además del número de copias, los sitios de inserción genómica de esta secuencia también son muy variables, dando como resultado patrones de bandas altamente variables mediante esta técnica (73).

La primera parte del RFLP consiste en la digestión del ADN purificado mediante una enzima de restricción que presenta un sitio de corte dentro de la secuencia de inserción IS6110. Posteriormente, los fragmentos se separan mediante electroforesis en geles de agarosa y se transfieren a una membrana de hibridación, donde se hibrida con una sonda complementaria a dicha

secuencia de inserción (139). El número de bandas obtenido está en relación con el número de copias de la secuencia IS6110 existentes en el genoma, mientras que su polimorfismo lo está con su distribución a lo largo del genoma y con las variaciones en los lugares de restricción dentro de esta secuencia y en las regiones más próximas (130).

Las limitaciones de esta técnica son las siguientes: precisa de una gran cantidad de ADN, impidiendo su uso a partir de muestra directa; no es útil para cepas que presentan un escaso número de copias de la secuencia escogida, puesto que disminuye la capacidad discriminativa de la técnica; y presenta dificultades a la hora de comparar los resultados entre laboratorios (130). No obstante, esta técnica ha sido considerada como de referencia para el estudio de la epidemiología molecular de la TB, tanto por su gran poder discriminativo como por su estabilidad (140).

1.11.2.2 *Tipificación mediante oligonucleótidos complementarios de secuencias espaciadoras: spoligotyping (spacer oligo typing)*

En el cromosoma del MTBC existen múltiples copias de la secuencia DR (*Direct Repeat*) ubicadas en un único *locus*, denominado región DR (130). Las secuencias repetidas DR están constituidas por 36 pb y se encuentran separadas por secuencias espaciadoras diferentes de 34-41 pb (138). Estas secuencias espaciadoras son muy polimórficas, bien debido a una recombinación homóloga entre DR o bien como consecuencia de la inserción de la secuencia IS6110 en esta zona. Basándose en este tipo de polimorfismo Kamerbeek *et al.* (141) estandarizó la técnica denominada *spoligotyping*. En una primera etapa se amplifican las regiones espaciadoras utilizando como cebadores dos oligonucleótidos complementarios a los extremos de la secuencia DR, marcados con biotina. En una segunda etapa, se detectan las distintas secuencias espaciadoras amplificadas mediante hibridación inversa del producto de PCR. De las 94 secuencias espaciadoras descritas en la mayoría de los protocolos sólo se estudian 43 (138). Los resultados se expresan como un número binario, facilitando que éstos sean fácilmente comparables entre laboratorios. Otra de las ventajas es que requiere de poca cantidad de ADN al tratarse de un técnica basada en PCR (130), pudiendo incluso realizarse a partir de muestra directa (142).

Su principal inconveniente es su poder discriminativo, el cual es inferior al del RFLP-IS6110 o al de la técnica MIRU-VNTR que se verá a continuación (143,144). Por esta razón, el *spoligotyping* se considera más útil para estudios filogenéticos que para la identificación de cadenas de transmisión (130).

1.11.2.3 *Unidades repetitivas intercaladas micobacterianas - repeticiones en tándem de número variable: MIRU-VNTR*

Las secuencias repetitivas en tándem están dispersas en prácticamente todos los genomas de eucariotas (145) y también se han descrito en procariontes (146). Muchos de estos *loci* presentan una gran variabilidad en el número de

repeticiones, por lo que son conocidos como repeticiones en tándem de número variable (VNTR) (147,148). Los polimorfismos en el número de repeticiones de estas regiones se emplean para la tipificación de cepas bacterianas (147).

En el caso concreto del MTBC, este tipo de secuencias también se han descrito y reciben el nombre de unidades repetitivas intercaladas micobacterianas (MIRU) (148). En el cromosoma de *M. tuberculosis* H37Rv se han encontrado 41 de estas secuencias (149) y están constituidas por repeticiones en tándem de entre 46 y 101 pb (130,148). Las diferencias en el número de repeticiones en tándem de algunas de dichas secuencias se han utilizado como método de tipificación para cepas del MTBC (MIRU-VNTR) (73). Este método de tipificación utilizaba inicialmente 12 *loci*, los más polimórficos, pero debido a la menor discriminación observada en comparación con otras metodologías (143,150-152), se estandarizó el análisis con 15 *loci* y, posteriormente, con 24 *loci*, que es el método utilizado en la actualidad (130,153,154).

La detección del número de repeticiones de cada *locus* se puede realizar mediante PCR individuales y posteriormente, interpretar la longitud del producto amplificado mediante electroforesis (73). Una alternativa más optimizada pero con mayor coste es realizar varias PCR múltiples, en las que los cebadores empleados se marcan con fluorocromos y los tamaños de los amplicones se determinan mediante secuenciación (73,130). En ambos casos, el tamaño del fragmento amplificado va en relación con el número de repeticiones de la secuencia iterativa presente en un determinado *locus*. Dicho número es el dígito para el *locus* estudiado dentro del código VNTR, que está compuesto por 24 dígitos (tantos como *loci* estudiados). Esta codificación facilita la exportación de los resultados y que éstos se puedan comparar a nivel mundial mediante el uso de bases de datos (130).

Otras de las ventajas de esta metodología es que es muy reproducible y discriminativa en comparación con la técnica RFLP-IS6110. Por lo que se ha convertido en la técnica de referencia para la tipificación del MTBC (130).

No obstante, la capacidad discriminativa de los *loci* utilizados puede variar dependiendo del linaje estudiado dentro del MTBC (40). Esto se debe a la homoplasia que presenta esta técnica, sobre todo entre los miembros de la familia Beijing (40,155,156). Para el análisis de esta familia se ha propuesto incluir *loci* adicionales que no están presentes en el esquema estandarizado (157). Por lo tanto, para determinados estudios puede ser necesario adaptar el esquema MIRU-VNTR a los linajes estudiados (130).

1.11.2.4 Secuenciación del genoma completo (WGS)

Los métodos de genotipificación clásicos que se han revisado estudian elementos genéticos hipervariables, pero solo interrogan una ínfima parte del genoma micobacteriano. Por consiguiente, no se pone de manifiesto la microevolución que puede ocurrir en otras regiones. En cambio, los enfoques

basados en secuenciación de genoma completo (WGS) mediante NGS, sí permiten disponer de casi toda la información del genoma (73). Debido a ello, diversos estudios demostraron que esta metodología presenta una resolución superior a la aportada hasta el momento por los métodos clásicos de genotipado (113,158-160).

Esta metodología se basa en la detección de polimorfismos de nucleótido único (SNP) presentes en el genoma micobacteriano de las cepas estudiadas, a partir de los cuales se generan árboles filogenéticos. Con estos árboles se infieren posibles cadenas de transmisión, correlacionándose mejor con los datos epidemiológicos que los obtenidos mediante otras metodologías (113,160). Es decir, el estudio de los SNP permite identificar a los miembros de una cadena de transmisión de otros aislados que estando relacionados no pertenecen a dicha cadena. Esto resulta especialmente útil para resolver situaciones de brotes complejos (113,160,161).

Además, los datos de la WGS permiten identificar al caso índice y diferenciarlo de los casos secundarios en una cadena de transmisión. Esto se debe a que los árboles filogenéticos generados a partir de SNP revelan el sentido en que las cepas han ido evolucionando a partir de un ancestro común. Así, en estudios longitudinales se observa como el acúmulo unidireccional de SNP permite diferenciar de forma más clara los casos nuevos de los casos precedentes e incluso detectar casos perdidos (113,160). También permiten identificar casos altamente contagiosos que conducen a múltiples casos secundarios, al observar en el árbol filogenético una tipología típica de estrella, en la que el caso índice ocupa una posición central (113,160).

Otra ventaja importante de la WGS es que permite predecir la resistencia frente a los antituberculosos de primera y segunda línea, así como una identificación filogenética altamente precisa (101,110,111,162-164).

El uso cada vez más extendido de esta metodología para la investigación y el control epidemiológico ha sido posible gracias a las rápidas mejoras y a la disminución del coste de las distintas técnicas basadas en NGS (160,164). No obstante, presenta algunos inconvenientes: a) aunque los costes han disminuido, todavía son elevados; b) el análisis bioinformático de los datos y su interpretación requiere de conocimientos en la materia, así como de potentes sistemas informáticos y de almacenamiento; c) todavía queda pendiente la estandarización de determinados aspectos técnicos, como qué región del genoma se debe tener en cuenta a la hora del análisis y cuál debe ser la cobertura mínima (73). Estos grandes desafíos están siendo abordados por grandes consorcios internacionales para acelerar la implementación de esta metodología tanto en el ámbito epidemiológico como en el clínico (73).

Introducción

2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Justificación y objetivos

La TB es una de las diez principales causas de muerte en el mundo y la primera debida a una enfermedad infecciosa (1). En la Comunidad Valenciana las tasas de TB han oscilado entre los 15 y los 8 casos por 100.000 habitantes entre los años 2008 - 2017 (6). Dados estos datos, así como la idiosincrasia de la enfermedad y del microorganismo, hacen que la identificación de las cadenas de transmisión de esta enfermedad sea crucial para intentar frenar su propagación.

Los métodos moleculares son una herramienta importante de apoyo para la epidemiología clásica en la identificación de las cadenas de transmisión de TB. De hecho, en la actualidad estos métodos ya respaldan en muchos países el estudio de contactos tradicional (73,129). Además, permiten discernir si los casos son reinfecciones o reactivaciones (135,136). Por esta razón nos proponemos estudiar una serie de cepas clínicas del MTBC aisladas de casos adscritos al Departamento de Salud Valencia – Hospital General.

El principal método molecular a emplear es la técnica MIRU-VNTR de 24 *loci*, dado que es considerada la técnica de referencia para la tipificación del MTBC (130,153,154). Además, en la actualidad existen diversos estudios que demuestran que la resolución de la secuenciación de genoma completo (WGS) es superior a la aportada por los métodos clásicos de genotipado (113,158-160). Por consiguiente, también aplicaremos esta metodología en el estudio de algunas de nuestras cepas.

Los objetivos que se plantean en el trabajo son los siguientes.

2.1 Objetivo general

Caracterizar molecularmente aislados clínicos del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

2.2 Objetivos específicos

1. Analizar las principales características demográficas y clínicas de los casos estudiados.
2. Identificar a nivel de especie todos los aislados clínicos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* incluidos en el estudio.
3. Estudiar genotípicamente aquellos aislados que presenten resistencias fenotípicas.
4. Estandarizar y adaptar la aplicación de la técnica MIRU-VNTR 24-*loci* para la genotipificación de aislados clínicos del MTBC en el Servicio de Microbiología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.
5. Analizar los datos obtenidos mediante MIRU-VNTR 24-*loci* usando herramientas bioinformáticas que permitan estudiar la variabilidad genética de dichos aislados.

Justificación y objetivos

6. Describir la distribución de los casos de TB agrupados y únicos en función de las variables demográficas y clínicas.
7. Comparar el poder discriminatorio de la técnica MIRU-VNTR 24-*loci* frente a MIRU-VNTR 15-*loci*.
8. Comparar la asignación de linajes y sub-linajes empleando las técnicas de MIRU-VNTR 24-*loci* y de tipado de SNP.
9. Describir la distribución de los diferentes linajes y sub-linajes encontrados en relación a las variables demográficas y clínicas de interés.
10. Comparar el poder discriminatorio de la técnica MIRU-VNTR 24-*loci* frente a la WGS.

3 METODOLOGÍA

Metodología

3.1 Diseño y ámbito del estudio

Se trata de un estudio descriptivo retrospectivo observacional de la distribución clonal de aislados clínicos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en el Departamento de Salud (DS) Valencia - Hospital General durante los años 2009 a 2015.

El criterio de inclusión inicial fue: aislamientos clínicos de MTBC obtenidos durante los años 2009 a 2010, dejando solo una cepa por paciente. Sin embargo, por un lado, con la finalidad de incorporar controles internos para la técnica MIRU-VNTR se emplearon dos cepas duplicadas. Y, por otro lado, para observar la posible microevolución de las cepas intra-paciente, en función de la localización de la infección y del tiempo, también se recogieron cepas procedentes de pacientes ya incluidos previamente, pero obtenidas bien de muestras diferentes, o bien de momentos distintos. Algunas de estas cepas se aislaron en el año 2011. Posteriormente, se decidió incluir cepas más recientes, pertenecientes a los años 2013 a 2015, debido a la posibilidad de ser secuenciadas y obtener datos genómicos que poder comparar con la técnica MIRU-VNTR. También se secuenció *a posteriori* alguna cepa antigua (2009-2010), por su interés desde un punto de vista epidemiológico.

Se empleó la cepa *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177) como cepa control, debido a que el tipado de ésta mediante la técnica MIRU-VNTR de 24 *loci* era conocido.

Las 154 cepas estudiadas procedían de pacientes que acudieron entre los años 2009 a 2015 a los diferentes Servicios de Salud del DS Valencia - Hospital General por sospecha de TB. El diagnóstico de confirmación de TB se centralizó en el Servicio de Microbiología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV), que actúa como laboratorio de referencia, realizando todos los diagnósticos microbiológicos del departamento. También recibe muestras o cepas de otros hospitales para los que el CHGUV es referencia, como el Hospital de Requena, o lo ha sido, como el Hospital de Manises. Además, el Centro Penitenciario de Picassent está adscrito al DS Valencia - Hospital General.

Este DS es uno de los 24 de la *Conselleria de Sanitat* (Figura 33) y da cobertura sanitaria a la zona sur-oeste de la ciudad de Valencia (Figura 35), así como a algunos municipios de las comarcas de *l'Horta Oest* (Torrent, Alaquàs, Picanya y Xirivella), *l'Horta Sud* (Picassent y Paiporta), *la Ribera Alta* (Montserrat, Real y Montroi), *la Canal de Navarrés* (Millares) y *la Foia de Bunyol* (Dos Aguas). Véase la Figura 34.

Metodología



Figura 33. Organización territorial de los Departamentos de Salud de la Comunidad Valenciana. Localización geográfica del DS Valencia - Hospital General.

Fuente: <http://www.san.gva.es/web/comunicacion/organizacion-territorial> (acceso el 08/12/2018).



Figura 34. Distribución geográfica de las poblaciones incluidas en el DS Valencia - Hospital general.

Fuente: Informe Anual 2015 del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.



Figura 35. Distribución geográfica de los Centros de Salud y Consultorios Auxiliares de la ciudad de Valencia incluidos en el DS Valencia - Hospital general.
 Fuente: Informe Anual 2015 del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

Los datos de población anual asignada al departamento según el Sistema de Información Poblacional (SIP) se recogen en la Tabla 7, siendo la media durante el estudio de 366.590 habitantes.

Tabla 7. Cobertura poblacional del Departamento de Salud Valencia - Hospital General. Datos obtenidos del Sistema de Información Poblacional (SIP).
 Fuente: Informes Anuales del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, años 2009-2015.

Valencia-Hospital General	
Año	Población de cobertura (número de habitantes)
2009	372.138
2010	370.420
2011	378.805
2012	364.968
2013	364.109
2014	358.518
2015	357.169

3.2 Definición de las variables

3.2.1 Variables demográficas

- **Edad de los casos.** La edad de los pacientes se toma en el momento de la recogida de la muestra a partir de la cual se aísla la cepa estudiada. Variable cuantitativa discreta. Medida en años. Dato extraído del Sistema Informático de Laboratorio (SIL).
- **Intervalos de edad.** Se generan a partir de la variable edad, clasificándola en intervalos de cinco años desde los 0 hasta los 90 años. Variable categórica ordinal.
- **Género.** Variable categórica dicotómica: hombre o mujer. Dato extraído del SIL.
- **País de origen.** Variable categórica nominal extraída de la historia clínica (HC). En algunos casos se transforma en dicotómica: España u otro origen.

3.2.2 Variables epidemiológicas

- **Tipo de caso.** Salud Pública tipifica los casos en función de si se trata de casos importados o autóctonos (165). Los casos importados son aquéllos que con toda probabilidad han desarrollado la enfermedad en su país de origen. Se considera como tales, a los pacientes extranjeros diagnosticados en España dentro de los cuatro primeros meses de residencia en nuestro país. Por otro lado, los casos autóctonos englobarían al resto de casos; es decir, aquéllos ocurridos en nuestro país o en los que no se puede descartar que haya sido así. Variable categórica dicotómica: autóctono o importado.
- **Antecedentes de contacto.** Datos extraídos de la HC. Variable categórica nominal: no, sí (conviviente, familiar no conviviente, instituciones cerradas, laboratorio, desconocido) o no consta en la HC.
- **Casos de tuberculosis clasificados mediante la técnica MIRU-VNTR como agrupados o únicos.** Son casos agrupados aquéllos que probablemente han estado involucrados en un proceso de transmisión reciente. Mientras que, los casos únicos son aquéllos en lo que no se ha hallado evidencia de ello. Variable categórica dicotómica.
- **Casos de tuberculosis clasificados mediante la técnica WGS como agrupados o únicos.** Son casos agrupados aquéllos que probablemente han estado involucrados en un proceso de transmisión reciente. Mientras que, los casos únicos son aquéllos en lo que no se ha hallado evidencia de ello. Variable categórica dicotómica.

3.2.3 Variables microbiológicas

- **Año del aislamiento.** Es el año en que se aisló la cepa del MTBC de un determinado paciente. Se toma como referencia la fecha de solicitud del estudio de TB que motivó el aislamiento de la cepa estudiada, extraído del SIL. Variable cuantitativa discreta.
- **Procedencia de las peticiones.** Extraído del SIL. Variable categórica nominal: Servicios del CHGUV, Hospital de Requena, Hospital de Manises, Centro Penitenciario de Picassent, Ambulatorio o no consta en la petición.
- **Tipos de muestras.** Se consideran muestras clínicas de origen pulmonar a los esputos, esputos inducidos, aspirados bronquiales, lavados bronco-alveolares, abscesos/biopsias pulmonares, jugos gástricos y líquidos pleurales. Mientras que, se consideran muestras extrapulmonares a los abscesos/biopsias de origen no pulmonar, líquidos estériles (excepto líquidos pleurales), muestras gastrointestinales (excepto jugo gástrico) y genitourinarias. Extraído del SIL. Variable categórica nominal.
- **Identificación de especie** dentro del complejo *M. tuberculosis* mediante la técnica GenoType MTBC. Variable categórica nominal: *M. tuberculosis*/*M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis spp bovis*, bacilo de Calmette-Guérin (BCG) o *M. bovis spp caprae*⁵.
- **Sensibilidad fenotípica frente a los antituberculosos de primera línea.** Datos obtenidos mediante el método de dilución en caldo/concentración crítica con los reactivos BD BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE Kit para estreptomycin, isoniazida, rifampicina y etambutol; mientras que para pirazinamida se empleó BD BACTEC™ MGIT™ 960 PZA Kit. La técnica se detalla en un apartado posterior (apartado 3.10.1). Cada uno de los antituberculosos estudiados se clasifica en sensible (S) o resistente (R). Variable categórica dicotómica.

El término sensible indica que la infección ocasionada por la cepa en cuestión puede tratarse de forma adecuada empleando las dosis habituales del antimicrobiano, en función del tipo de infección. Por otro lado, el término resistente se refiere a aquellos microorganismos que no se inhiben por las concentraciones habitualmente alcanzadas en sangre/tejido del antimicrobiano, o a aquellos microorganismos en los que existen mecanismos de resistencias específicos para el agente estudiado, corroborado por una inadecuada respuesta clínica a dicho tratamiento.

La definición puramente microbiológica de la resistencia se basa en la realizada por Mitchison en 1962: “Resistencia se define como una

⁵Aunque Genotype MTBC da esta identificación, en la actualidad ya no se considera una subespecie de *M. bovis*, sino una especie en sí misma (23,24).

disminución de la sensibilidad de tal grado, como para estar seguros de que la cepa es diferente de una muestra de cepas salvajes que nunca hayan estado en contacto con el fármaco” (95). Actualmente se habla de resistencia cuando el 1% o más de la población bacteriana del MTBC es resistente a una concentración crítica de un determinado fármaco, y se ha demostrado que existe una buena correlación clínica con todos los fármacos antituberculosos de primera línea (95). Sin embargo, en el caso de los fármacos de segunda línea, no se ha demostrado en todos los casos (95).

- **Sensibilidad genotípica frente a los antituberculosos.** Datos obtenidos mediante GenoType MTBDR*plus* o mediante WGS. Ambas técnicas se explican posteriormente (puntos 3.10.2.1 y 3.10.2.2, respectivamente). Cada uno de los antituberculosos estudiados se clasifican en sensible (S) o resistente (R). Esta categorización se basa en los mismos criterios que se han comentado en la variable anterior, con la salvedad de que se establece en función de la presencia de mutaciones cromosómicas irreversibles que permiten predecir la resistencia. Variable categórica dicotómica.
- **Clasificación de las cepas de *M. tuberculosis* en linajes y sub-linajes.** Datos obtenidos mediante las técnicas MIRU-VNTR o tipado de SNP (HRM o WGS). Estas técnicas se explican posteriormente (apartados 3.11 y 3.12). Variable categórica nominal.

3.2.4 Variables clínicas

- **Diagnóstico clínico.** Hace referencia a la forma de presentación de la enfermedad tuberculosa o al lugar de la infección, clasificándose en TB pulmonar, TB extrapulmonar o TB miliar. Esta clasificación se establece en función del tipo de muestra en la que se ha aislado el agente causal junto con los datos clínicos del paciente según CIE-10. Por tanto, los datos son recogidos del SIL y de la HC. En los casos de TB pulmonar se incluyen los casos con infección en dicha localización y también casos de tuberculosis pleural, cuando se trate de tuberculosis respiratoria primaria (CIE-10). La TB extrapulmonar engloba casos de TB cuyo foco es distinto del anterior y la miliar incluye infección diseminada o generalizada. Se trata de una variable categórica nominal.
- **Casos bacilíferos o estado bacilífero del paciente.** Permite la clasificación de los casos de TB pulmonar según su grado de infecciosidad. También se incluyen los casos de TB miliar con afectación pulmonar. Se clasifican como bacilíferos aquellos casos con microscopía directa de una muestra de esputo o esputo inducido positiva en el momento del diagnóstico y no bacilíferos en caso contrario. Variable categórica dicotómica.
- **Coinfección por el VIH.** Clasificación en función de si los pacientes presentan infección simultánea por el VIH en el momento del diagnóstico

de la TB. La determinación de la presencia de anticuerpos anti-VIH tipo 1 o tipo 2 se realizó en aquellos casos con petición serológica mediante ELISA (Architect® i2000SR, Abbott) y confirmación por *Western Blott* (INNO-LIA® HIV I/II Score, Fujirebio). Variable categórica nominal: sí, no o no consta en SIL. En algunos casos esta variable se transforma en dicotómica dejando fuera los casos sin este dato.

- **Presencia de sintomatología** en el momento de la toma de la muestra. También se especifica si la sintomatología es respiratoria y/o general inespecífica (como por ejemplo: astenia, anorexia, pérdida de peso, diaforesis nocturna, febrícula o fiebre). Datos recogidos de la HC. Se trata de variables categóricas nominales: sí, no o no consta en la HC.
- **Situación evolutiva** de los pacientes. Dato recogido de la HC, en el que se especifica si se trata de un caso nuevo, si se ha tratado previamente, si se considera una probable contaminación intra-laboratorio (a criterio del clínico responsable del paciente) o no consta en la HC. Es una variable categórica nominal. Se define caso nuevo cuando el paciente nunca ha recibido tratamiento antituberculoso, o bien lo ha recibido pero durante un periodo de tiempo inferior a un mes (165). Mientras que, un caso tratado previamente sí habría recibido tratamiento antituberculoso (excluyendo la quimioprofilaxis) al menos durante un mes (165). Estos casos incluirían las recidivas, los tratamientos tras abandono, los fallos terapéuticos y otros casos, como los crónicos.
- **Antecedentes y comorbilidades.** En este apartado se engloban comorbilidades como diabetes mellitus y neoplasias, así como antecedentes de conductas adictivas como enolismo y usuarios/exusuarios de drogas por vía parenteral (UDVP). Datos extraídos de la HC. Son variables categóricas nominales: sí, no o no consta en la HC. En algún caso se prescinde del dato “no consta” para transformarla en una variable dicotómica.
- **Ingreso hospitalario.** Hace referencia a si el paciente ingresó en el hospital o ya lo estaba en el momento de la recogida de la muestra. Variable categórica nominal extraída de la HC: sí, no o no consta en la HC.
- **Evolución de los pacientes tras el diagnóstico.** Se trata de una variable categórica nominal extraída de la HC. Para realizar esta clasificación se siguen los criterios seguidos por Salud Pública recogidos en los informes anuales de TB de la Comunidad Valenciana (165), que se guían, a su vez, por las normas para la evaluación estandarizada de los programas de control de la TB en los países de la Región Europea. Según los cuales, para el seguimiento de los resultados al finalizar el tratamiento se emplean siete categorías con definiciones estandarizadas y mutuamente excluyentes, que son:

- **Curación:** paciente que ha completado el tratamiento y presenta negativización de las pruebas microbiológicas en muestras tomadas durante y al final del tratamiento.
- **Tratamiento completo:** paciente que ha completado el tratamiento y no cumple criterios para ser clasificado como curación o fracaso terapéutico.
- **Fracaso terapéutico:** paciente que cinco meses después de iniciado el tratamiento, y habiéndolo realizado correctamente, no ha alcanzado la conversión bacteriológica, o que, habiéndola realizado, presenta una reversión de ésta, y al que es preciso cambiar el tratamiento de primera línea por tratamiento de segunda línea.
- **Traslado:** paciente que se ha mudado de residencia y por ello ha sido transferido a otro sistema de registro, y cuyos resultados terapéuticos son desconocidos.
- **Abandono:** paciente que ha interrumpido el tratamiento durante dos o más meses, sin que se deba a una decisión facultativa; o bien, paciente perdido en el seguimiento antes de que haya finalizado su tratamiento.
- **Muerte:** paciente que ha fallecido por cualquier causa durante el curso del tratamiento.
- **Otro, no evaluado:** paciente que continúa en tratamiento a los 12 meses de haberlo iniciado y que cumple cualquiera de las siguientes condiciones:
 - Tratamiento prolongado como consecuencia de efectos secundarios/complicaciones.
 - Tratamiento inicial planificado con una duración mayor de 12 meses.
 - No hay información sobre las causas que han motivado que el paciente se encuentre todavía en tratamiento.

Además de estas categorías se incluyen por nuestra cuenta otras dos:

- Probable contaminación intra-laboratorio.
- No consta en la HC.

3.2.5 *Variables temporales*

Datos temporales relacionados con el diagnóstico microbiológico de TB:

- **Tiempo hasta la asistencia sanitaria y sospecha de TB.** Variable cuantitativa continua que mide el tiempo en días desde el inicio de la sintomatología hasta la fecha de solicitud del estudio microbiológico de

TB. Información extraída de la HC y del SIL. Véase Figura 36 situación a.

- **Tiempo de diagnóstico microbiológico.** Variable cuantitativa continua que mide el tiempo en días desde la toma de muestra hasta el diagnóstico microbiológico. Véase Figura 36 situación b.
- **Tiempo desde el diagnóstico microbiológico hasta el inicio del tratamiento.** Variable cuantitativa continua. Tiempo medido en días. Véase Figura 36 situación c.

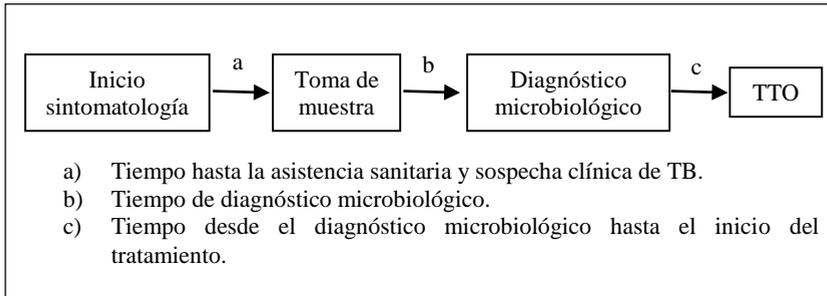


Figura 36. Cronología asistencial de los casos de TB estudiados.
 Abreviaturas: TTO – tratamiento.

3.3 Definiciones

3.3.1 Tipos de resistencia a los antituberculosos

Los tipos de resistencia a los antituberculosos definidos según la OMS⁶ se muestran a continuación:

- **Monorresistencia:** resistencia a un solo antituberculoso de primera línea.
- **Polirresistencia:** resistencia a más de un antituberculoso de primera línea distinto de la isoniazida y la rifampicina.
- **Multirresistencia (MR o MDR):** resistencia al menos a isoniazida y rifampicina.
- **Ultrarresistencia (XR o XDR):** resistencia a cualquier fluoroquinolona y al menos a uno de los tres antituberculosos inyectables de segunda línea (capreomicina, kanamicina y amikacina), sumada a la multirresistencia.
- **Resistencia a la rifampicina:** resistencia a la rifampicina detectada mediante métodos fenotípicos o genotípicos, con o sin resistencia a otros antituberculosos. Incluye cualquier resistencia a la rifampicina en forma de monorresistencia, polirresistencia, MR o XR.

⁶Fuente: página web de la OMS consultada el 13/12/2018. <https://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/types/es/>

Otras definiciones epidemiológicas establecidas por la OMS:

- **Resistencia en casos nuevos:** cepas aisladas en individuos que nunca han recibido tratamiento antituberculoso durante más de un mes (10). Corresponde con la anteriormente denominada resistencia primaria.
- **Resistencia en casos tratados:** cepas aisladas en individuos que previamente han recibido tratamiento antituberculoso durante más de un mes (10). Corresponde con la anteriormente denominada resistencia adquirida.

3.4 Mantenimiento y recuperación de los aislados

Las cepas clínicas objeto de estudio se conservaron en el cepario de micobacterias del Servicio de Microbiología del CHGUV. Se mantuvieron a -80°C suspendidas en solución acuosa de glicerol (Merck, Darmstadt) al 10% (v/v). Los aislados seleccionados se descongelaron y se inocularon en el medio de cultivo de Löwenstein-Jensen, incubándose en estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ y atmósfera convencional. Se comprobó el crecimiento cada 7 días. Todas las cepas vivas de MTBC se trabajaron en el laboratorio de nivel 3 de bioseguridad del Servicio de Microbiología del CHGUV, dentro de cabina de seguridad biológica de clase IIA (166,167).

3.5 Identificación fenotípica de los aislados

Se estudiaron las características morfológicas de cada cepa y se les realizó una tinción de Ziehl-Neelsen para comprobar la pureza de los cultivos, descartando así posibles contaminaciones con otros microorganismos no ácido alcohol resistentes.

3.6 Identificación del complejo MTB

La identificación del complejo *M. tuberculosis* se llevó a cabo mediante la prueba inmunocromatográfica BD MGIT TBc (Becton, Dickinson and Company) a partir de los tubos MGIT positivos (Mycobacterial Growth Indicator Tube, BD) siguiendo las indicaciones del fabricante en el momento del diagnóstico.

3.7 Extracción y purificación del ADN

Las cepas correctamente crecidas se inocularon en viales con tampón TE 1X pH 8,0 (compuesto por Tris-HCl a 10 mM y EDTA a 1 mM) y se inactivaron a 95°C durante 15 minutos. Posteriormente, se realizó la extracción y purificación del ADN de forma automatizada mediante el equipo MagCore® HF16 empleando el reactivo comercial MagCore® *Viral Nucleic Acid Extraction Kit* (RBC Bioscience Corp). Este tipo de extracción automatizada se empleó en todas las técnicas que precisaron de ADN, salvo en la secuenciación de genoma completo.

3.7.1 Extracción y purificación del ADN para secuenciación

Para la realización de la técnica de secuenciación de genoma completo, el ADN fue extraído y purificado como indica Soilingen *et al.* (168). Se partió de una suspensión de micobacterias, preparada con dos asas bacteriológicas de 10 µl bien cargadas en tubos de 1,5 ml con 500 µl de TE 1X (Tris-HCl a 10 mM pH 8,0 y EDTA a 1 mM). La suspensión se calentó a 95°C durante 15 minutos para destruir las células (inactivación). Posteriormente, se adicionó lisozima a una concentración final de 1 mg/ml, se homogenizó por inversión suave y se incubó 18 horas a 37°C. Tras lo cual, se añadieron 70 µl de dodecil sulfato sódico (SDS) al 10% (p/v) y 6 µl de proteinasa K (10 mg/ml), incubándose a continuación 10 minutos a 65°C con agitación constante. Se incorporaron 100 µl NaCl 5 M y 100 µl de CTAB (bromuro de N,N,N-trimetil,1-Hexadecan-amino o bromuro de cetiltrimetilamonio)/NaCl. Se agitó vigorosamente hasta que adquirió un color blanquecino y luego se incubó 10 minutos a 65°C. Seguidamente, se añadió el mismo volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1, v/v) y se agitó durante 10 segundos. Después de la centrifugación durante 5 minutos, se transfirió la fase superior a un nuevo tubo y se añadió 0,6 volúmenes de isopropanol frío, homogenizando cuidadosamente por inversión para la precipitación del ADN. Tras 30 minutos a -20°C y centrifugación durante 15 min, el sedimento se lavó una vez con etanol frío al 70%. Se volvió a centrifugar 5 minutos y el sedimento secado al aire se resuspendió con 50 µl de TE 0,1X.

3.8 Cuantificación del ADN

El ADN extraído y purificado se cuantificó mediante fluorimetría (Qubit® 4.0, Thermo Fisher Scientific) y la calidad del ADN se determinó por espectrometría (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific).

3.9 Diferenciación de especies dentro del MTBC

La identificación a nivel de especie de las cepas englobadas dentro del complejo *M. tuberculosis* se realizó mediante la técnica comercial GenoType® MTBC (Hain Lifescience GmbH). Dicha técnica consiste en una amplificación simultánea de los fragmentos del gen ARNr 23S, del gen *gyrB* y de la región RD1 (*region of difference 1*) con cebadores biotinilados, seguida de una hibridación inversa en tira. Las dianas en los fragmentos del gen *gyrB* y RD1 comprenden secuencias específicas de especie. Mientras que, los fragmentos amplificados del gen ARNr 23S comprenden secuencias propias de bacterias grampositivas ricas en GC (control de amplificación o control universal - UC) así como secuencias específicas para todos los miembros del MTBC (169,170).

En la Figura 37 se muestran los seis patrones diferentes que se pueden obtener mediante esta técnica, correspondientes a *M. tuberculosis*/*M. canettii*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. caprae* y *M. microti*. Las bandas de hibridación 4 a 12 discriminan entre las distintas especies basadas en

Metodología

polimorfismos del gen *gyrB*, mientras que, la banda 13 es una sonda específica para *M. bovis* BCG (delección de RD1) (169).

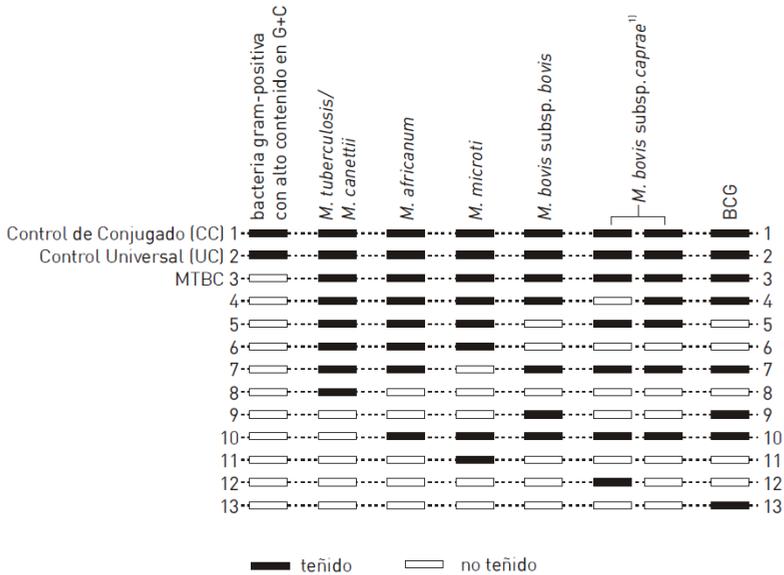


Figura 37. Tabla de interpretación para el ensayo GenoType MTBC.

Extraído del manual de la propia técnica.

¹Aproximadamente el 5% de las subespecies de *M. bovis* spp *caprae* muestran un patrón de bandas de acuerdo con la columna de la derecha. Actualmente se denomina *Mycobacterium caprae*.

El ensayo se realizó partiendo de 5 µl de ADN extraído y purificado (visto en el apartado 3.7) siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.10 Estudios de sensibilidad frente a fármacos antituberculosos

Se llevaron a cabo estudios de sensibilidad frente a antituberculosos de primera línea tanto fenotípicos como genotípicos, los cuales se detallan en los siguientes subapartados.

3.10.1 Estudios de sensibilidad fenotípica

En la actualidad, los métodos fenotípicos recomendados en países con recursos para el estudio de sensibilidad de los antituberculosos de primera línea son aquéllos que se realizan en medio de cultivo líquido de forma automatizada, puesto que tienen unos periodos de incubación más cortos que los que emplean medios sólidos, los cuales se consideran como de referencia (95). No obstante, estos ensayos en medios líquidos se han correlacionado previamente de forma adecuada con el método de referencia de las proporciones en agar (95).

En este estudio se empleó el sistema comercial Bactec™ MGIT™ 960 (Becton, Dickinson and Company), un ensayo automatizado no radiométrico en medio líquido, concretamente el Middlebrook 7H9 suplementado. La evidencia de crecimiento se detecta por el consumo de oxígeno (95). Para el estudio de la sensibilidad a estreptomycin (SM), isoniazida (INH), rifampicina (RMP) y etambutol (EMB) se empleó el reactivo comercial *BD BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE Kit* (Becton, Dickinson and Company) y para la pirazinamida (PZA) el *BD BACTEC™ MGIT™ 960 PZA Kit* (Becton, Dickinson and Company). Ambos adaptados al Bactec™ MGIT™ 960 y basados en el método de las concentraciones críticas.

Las concentraciones críticas de los diferentes fármacos fueron establecidas por consenso internacional y representan las concentraciones más bajas que inhiben el crecimiento de las «cepas salvajes» (sensibles) del complejo *M. tuberculosis* que nunca han estado expuestas a los mismos, mientras que no inhiben a las cepas procedentes de pacientes que no responden al tratamiento, consideradas resistentes (80). Por consiguiente, la concentración crítica se define como la concentración de antibiótico que permite interpretar un resultado como resistente o sensible. Inicialmente fueron postuladas para el medio de Löwenstein-Jensen, y después se establecieron equivalencias para los medios de agar 7H10 y 7H11 de Middlebrook, así como para los sistemas automatizados de cultivo en medio líquido (80,95). Las concentraciones críticas empleadas por dicha técnica para el estudio de la sensibilidad a los fármacos antituberculosos de primera línea se describen en la Tabla 8.

Tabla 8. Concentraciones críticas empleadas para el estudio de la sensibilidad a los fármacos antituberculosos de primera línea.

Fuente: manual de los ensayos *BD BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE Kit* y *BD BACTEC™ MGIT™ 960 PZA Kit*.

Fármacos	Concentración crítica (µg/ml)
Isoniazida	0,1
Estreptomycin	1,0
Etambutol	5,0
Rifampicina	1,0
Pirazinamida	100,0

El estudio de sensibilidad fenotípico se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante en el momento del aislamiento de cada una de las cepas, según el protocolo establecido por la Sección de Micobacterias del Servicio de Microbiología del CHGUV. Los datos obtenidos mediante Bactec™ MGIT™ 960 para cada uno de los fármacos fueron interpretados e informados mediante el SIL. Por consiguiente, al tratarse de un estudio retrospectivo, los datos de sensibilidad frente a los antituberculosos de primera línea de cada una de las cepas estudiadas fueron extraídos desde el SIL.

3.10.2 Estudios de sensibilidad genotípica

Se llevó a cabo mediante dos metodologías. Una basada en PCR múltiple e hibridación inversa y otra basada en la secuenciación de genoma completo (WGS). Las cuales se describen en los siguientes subapartados.

3.10.2.1 *GenoType MTBDRplus*

El estudio genotípico de resistencias frente a isoniazida y rifampicina mediante la técnica comercial *GenoType*[®] *MTBDRplus* versión 2.0. (Hain Lifescience GmbH) se realizó a aquellas cepas con resistencias fenotípicas a alguno de estos dos fármacos, o bien, según indicación clínica o valoración clínico-microbiológica en el momento del aislamiento.

Esta técnica permite identificar la resistencia a RMP mediante la detección de las mutaciones más significativas del gen *rpoB*, que codifica la subunidad β de la ARN polimerasa. Por otro lado, la resistencia a INH es detectada por mutaciones en el gen *katG* (codifica la catalasa peroxidasa) y en el promotor del gen *inhA* (codifica la NADH-enoil-ACP- reductasa). El procedimiento de dicha técnica consta de tres etapas: extracción del ADN, amplificación mediante PCR múltiple con cebadores marcados con biotina e hibridación inversa en tira.

Por lo que respecta a la interpretación de los resultados, se realizó siguiendo el manual de dicha técnica (171), el cual se explica a continuación. En primer lugar, las tiras del ensayo presentan tres bandas al inicio, denominadas CC, AC y TUB.

- Banda CC. Es el control del conjugado y documenta la eficacia de la unión del conjugado y la reacción con el sustrato.
- Banda AC. Es el control de la amplificación. En caso de un resultado positivo (cualquier banda, ya sea tipo salvaje como mutación), la señal de esta sonda puede ser débil o incluso desaparecer por completo. Esto puede deberse a la competencia de las reacciones durante la amplificación. En estos casos, la prueba se realizó correctamente y no debe repetirse. En cambio, si se diese un resultado negativo y la banda AC no aparece, el ensayo no es válido y debe repetirse.
- Banda TUB. Su presencia indica que se trata de una cepa perteneciente al complejo *M. tuberculosis*.

El resto de las sondas de hibridación presentes en la tira son las siguientes:

- Control del *locus*: *rpoB*, *katG* e *inhA*. Detectan una región específica de cada uno de los genes estudiados.
- Tipo salvaje (WT). Comprenden las regiones de resistencia más importantes de los genes respectivos (véase la Figura 38, así como la Tabla 9, Tabla 10 y Tabla 11). Cuando todas las sondas de tipo salvaje de un gen son positivas, significa que no se detectan mutaciones

dentro de las regiones examinadas. Por lo que la cepa ensayada sería sensible al fármaco respectivo. Mientras que, en caso de existir una mutación, el amplicón respectivo no puede unirse a la sonda de tipo salvaje correspondiente. Por tanto, la ausencia de señal en al menos una de las sondas de tipo salvaje sería indicativo de resistencia al antituberculoso en cuestión.

- Mutación (MUT). Detecta algunas de las mutaciones más comunes que confieren resistencia a RMP e INH (véase la Tabla 9, Tabla 10 y Tabla 11). Mutaciones en el gen *rpoB* son indicativas de resistencia a RMP, mientras que las mutaciones en los genes *katG* e *inhA* lo son para INH.

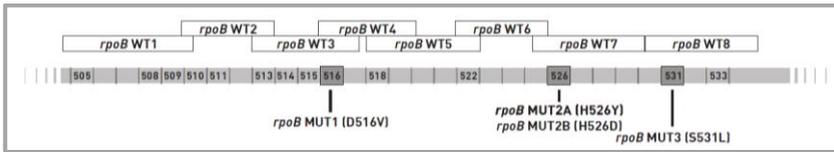


Figura 38. Regiones de resistencia del gen *rpoB* y las mutaciones más comunes que confieren resistencia a RMP detectadas por el ensayo GenoType® MTBDRplus versión 2.0. Los números especifican las posiciones de los aminoácidos (codones) para todas las mutaciones enumeradas en la Tabla 9, referenciado al genoma de *E. coli*⁷. Se resaltan los codones para los que se diseñaron las sondas de las mutaciones. Abreviaturas: *rpoB* WT1-8 - sondas de tipo salvaje en *rpoB*; *rpoB* MUT1-3 - sondas de mutaciones en *rpoB*. Fuente: Manual de usuario del ensayo GenoType MTBDRplus v.2.0. IFU-304A-06. (171)

⁷ Para transformar los codones del gen *rpoB* a la nomenclatura de *M. tuberculosis* desde la nomenclatura referida a *E. coli*, restar 81 (172).

Metodología

Tabla 9. Correlación entre las mutaciones en el gen *rpoB* y las bandas correspondientes tipo salvaje y mutación del ensayo GenoType® MTBDRplus versión 2.0. Las posiciones de los codones hacen referencia al genoma de *E. coli*. Fuente: Manual de usuario del ensayo GenoType MTBDRplus v.2.0. IFU-304A-06. (171)

Failing wild type band(s)	Codons analyzed	Developing mutation band	Mutation
<i>rpoB</i> WT1	505-509		F505L T508A S509T
<i>rpoB</i> WT2	510-513		E510H L511P*
<i>rpoB</i> WT2/WT3	510-517		Q513L* Q513P del514-516
<i>rpoB</i> WT3/WT4	513-519	<i>rpoB</i> MUT1	D516V D516Y del515
<i>rpoB</i> WT4/WT5	516-522		del518* N518I
<i>rpoB</i> WT5/WT6	518-525		S522L S522Q
<i>rpoB</i> WT7	526-529	<i>rpoB</i> MUT2A <i>rpoB</i> MUT2B	H526Y H526D H526R H526P* H526Q* H526N H526L H526S H526C
<i>rpoB</i> WT8	530-533	<i>rpoB</i> MUT3	S531L S531Q* S531W L533P

*Mutaciones poco frecuentes que solo se detectaron *in silico*. Abreviaturas: *rpoB* WT1-8 - sondas de tipo salvaje en *rpoB*; *rpoB* MUT1-3 - sondas de mutaciones en *rpoB*.

Tabla 10. Correlación entre las mutaciones en el gen *katG* y las bandas correspondientes de tipo salvaje y de mutación. Ensayo GenoType® MTBDRplus versión 2.0. Las posiciones de los codones hacen referencia al genoma de la cepa H37Rv. Abreviaturas: *katG* WT - sondas de tipo salvaje en *katG*; *katG* MUT1-2 - sondas de mutaciones en *katG*. Fuente: Manual de usuario del ensayo GenoType MTBDRplus v.2.0. IFU-304A-06. (171)

Failing wild type band	Codon analyzed	Developing mutation band	Mutation
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1 <i>katG</i> MUT2	S315T1 S315T2

Tabla 11. Correlación entre las mutaciones en la región del promotor del gen *inhA* y las bandas correspondientes de tipo salvaje y mutación. Ensayo GenoType® MTBDRplus versión 2.0.

Las posiciones de los codones hacen referencia al genoma de la cepa H37Rv. Abreviaturas: *inhA* WT1-2 - sondas de tipo salvaje en *inhA*; *inhA* MUT1-3 - sondas de mutaciones en *inhA*. Fuente: Manual de usuario del ensayo GenoType MTBDRplus v.2.0. IFU-304A-06. (171)

Failing wild type band	Analyzed nucleic acid position	Developing mutation band	Mutation
<i>inhA</i> WT1	-15	<i>inhA</i> MUT1	C-15T
	-16	<i>inhA</i> MUT2	A-16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A	T-8C
		<i>inhA</i> MUT3B	T-8A

La realización de GenoType® MTBDRplus v. 2.0. se llevó a cabo con 5 µl de ADN extraído y purificado (apartado 3.7) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los resultados del GenoType MTBDRplus se compararon con los datos fenotípicos, tomando estos últimos como referencia, calculándose la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de GenoType MTBDRplus v.2.0. para isoniazida y rifampicina.

3.10.2.2 Secuenciación de genoma completo (WGS)

La secuenciación de genoma completo permite la predicción de la resistencia de MTBC frente a los antituberculosos (101,108,173,174). La metodología de esta técnica se describe en el apartado 3.13. Una vez obtenidas las lecturas de las cepas secuenciadas limpias y filtradas, se llevó a cabo un análisis de polimorfismos para detectar y extraer las mutaciones asociadas con resistencia a fármacos antituberculosos. Las bases de datos consultadas para la predicción de resistencia en función de las mutaciones encontradas fueron PhyResSe (109) y ReSeqTB (110). Se obtuvo información sobre la sensibilidad a fármacos de primera línea (INH, RMP, EMB, SM y PZA) y algunos de segunda línea, como: fluoroquinolonas (FQ), amikacina (AMK), kanamicina (KAN), capreomicina (CPR), etionamida (ETH) y resistencia cruzada entre isoniazida y etionamida.

Se compararon los resultados de GenoType MTBDRplus respecto a los datos de predicción de resistencia obtenidos mediante WGS, considerando la secuenciación como técnica de referencia para realizar esta comparación. A partir de dicha comparación se calculó la sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de GenoType MTBDRplus v.2.0. para isoniazida y rifampicina.

También se compararon los datos de sensibilidad frente a antituberculosos de primera línea obtenidos *in silico* tras secuenciación con los resultados fenotípicos (técnica de referencia) obtenidos mediante *BD BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE* y *PZA*; calculando S, E, VPP y VPN.

3.11 MIRU-VNTR

Es una técnica de genotipificación basada en el número variable de repeticiones en tándem (VNTR) aplicado a elementos genéticos denominados unidades repetitivas intercaladas de micobacterias (MIRU), de ahí la denominación MIRU-VNTR. La tipificación de las distintas cepas se realiza por la detección de polimorfismos en cada uno de los *locus* estudiados, basados en el número de veces que se repite cada una de esas unidades en un determinado *locus*. Ese número se emplea como un código específico de esa cepa para ese *locus*. Posteriormente, se determinan los polimorfismos del resto de *loci*, en nuestro caso veinticuatro, obteniendo un genotipo que se puede comparar con otras cepas.

La detección de estos polimorfismos se realiza mediante la amplificación de determinados *loci* que presentan dichas unidades de repetición en regiones intergénicas, como se describe en el siguiente apartado.

3.11.1 Procedimiento

Se aplicó la técnica de tipificación molecular MIRU-VNTR de 24 *loci*, descrita por Supply *et al.* (175) incorporando algunas modificaciones. La principal modificación consistió en el empleo de una *master mix* comercial premezclada, tomando la idea de de Beer *et al.* (176). En nuestro caso se utilizó el reactivo comercial *GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix* (Promega Corporation).

Se realizaron veinticuatro PCR simples por cepa, una por cada *locus*. Los volúmenes de reactivos por reacción se detallan en la Tabla 12 y la Tabla 13. Los cebadores empleados y las condiciones de la PCR (Tabla 14) fueron los descritos por Supply *et al.* (175). Las PCR se realizaron en microtubos de 0,2 ml con tapones abovedados (MicroAmp™, Applied Biosystems) con el equipo *Veriti™ Thermal Cycler* (Applied Biosystems). Cada tanda de PCR se realizó siempre con un control positivo (H37Ra ATCC® 25177™) y un control negativo (agua grado biología molecular).

Tabla 12. Volúmenes de reactivos empleados en la PCR para todos los *loci*, excepto 2059, 3690 y 4156.

Reactivos	Volumen (µl) 1x
<i>Master mix</i>	12,5
Cebador directo (50 µM)	0,2
Cebador inverso (50 µM)	0,2
H ₂ O	10,1
ADN (1 ng/µl)	2,0
TOTAL	25,0

Tabla 13. Volúmenes de reactivos empleados en la PCR para los *loci* 2059, 3690 y 4156. La diferencia respecto a las condiciones mostradas en la Tabla 12 radica en el empleo de dimetilsulfóxido (DMSO).

Reactivos	Volumen (μl) 1x
<i>Master mix</i>	12,5
Cebador directo (50 μM)	0,2
Cebador inverso (50 μM)	0,2
DMSO (10 %)	1,0
H ₂ O	9,1
ADN (1 ng/μl)	2,0
TOTAL	25,0

Tabla 14. Condiciones de la PCR, descritas previamente por Supply *et al.* (175).

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	15'	1
Desnaturalización	94	1'	40
Hibridación	59	1'	
Extensión	72	1' 30''	
Extensión final	72	10'	1
Mantenimiento	4	∞	1

Previamente a la genotipificación de las cepas a estudiar se realizó la validación de la técnica con la cepa control H37Ra ATCC® 25177™, cuyo mirutipo ya era conocido.

La visualización de los fragmentos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (SERVA Electrophoresis GmbH) a una concentración de un 2 % (176), empleando como tampón electroforético TBE (Thermo Fisher Scientific) al 0,5x. Como colorante del ADN se empleó el reactivo *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Thermo Fisher Scientific) incorporado directamente al propio gel antes de la solidificación a una concentración de 10 μl/100 ml.

Para determinar el tamaño de los amplicones analizados se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Fisher Scientific). Éste se incorporó en tres pocillos de cada gel (6 μl/pocillo), dos pertenecientes a los carriles de los extremos y uno a mitad del gel. La migración electroforética se realizó en una cubeta electroforética (Bio-Rad Laboratories, Inc.) a 90 V durante 150 minutos (fuente de alimentación PS300B, Hoefer, Inc.). En todas las carreras se incorporaron los controles positivo y negativo utilizados previamente para la PCR.

Durante el análisis de las cepas se incorporaron además dos controles internos, mediante el empleo de cepas duplicadas con identificadores distintos.

3.11.2 Interpretación y análisis

La asignación del número de repeticiones en tándem en función del peso molecular de los amplicones se realizó con la tabla descrita por Supply *et al.* (175), recogida en el Apéndice VI. Tras la interpolación del peso molecular en dicha tabla, se obtuvo como resultado un número, equivalente a la variante alélica o al número de repeticiones (VNTR) de un *locus* concreto. Una vez obtenidos los datos de los veinticuatro *loci* por cepa, estos códigos numéricos se subieron a la base de datos mundial *on-line* creada por el Instituto Pasteur de Lille, denominada MIRU-VNTRplus⁸ (178,179), permitiendo comparar las cepas analizadas con las cepas de referencia presentes en dicha base, para la asignación de especie, linaje y genotipo MIRU, mediante la nomenclatura MLVA MtbC15-9.

Dicha nomenclatura consiste en un código estandarizado asignado a los distintos patrones MIRU-VNTR, facilitando la comunicación científica de los resultados (177). Combina los subtipos MLVA MtbC15 y MLVA MtbC9, basados en dos conjuntos de *loci* MIRU-VNTR con diferentes niveles de variabilidad dentro de complejos clonales, como se deduce del análisis de las frecuencias de variación de un solo *locus* estudiado por Supply *et al.* (154). La nomenclatura MLVA MtbC15 emplea los 15 *loci* más discriminatorios según dicho artículo, que son: 424, 577, 580, 802, 960, 1644, 1955, 2163b, 2165, 2401, 2996, 3192, 3690, 4052 y 4156. Mientras que MLVA MtbC9 incluye 9 *loci* auxiliares: 154, 2059, 2347, 2461, 2531, 2687, 3007, 3171 y 4348.

Una vez subidas las cepas, la plataforma MIRU-VNTRplus asignó automáticamente los tipos conocidos de MLVA MtbC15-9. En los casos en que no hubo coincidencia con ningún tipo de la base de datos, la plataforma les asignó la nomenclatura adecuada y fueron añadidas a la base de datos.

Por otro lado, a partir de la información MIRU-VNTR de todas las cepas estudiadas se calculó la frecuencia alélica para cada *locus* y su diversidad alélica, también denominada poder discriminatorio, que determina el grado de variabilidad de un *locus*.

También se estudió la presencia de complejos clonales entre las cepas analizadas empleando la plataforma MIRU-VNTRplus, permitiendo establecer posibles relaciones epidemiológicas (180,181). El análisis de las relaciones genéticas se basó en la distancia categórica medida entre los datos MIRU de las distintas cepas. Esta distancia simplemente anota el número de marcadores con un alelo diferente dividido por el número total de marcadores utilizados (177). Es la aplicada por defecto por MIRU-VNTRplus, puesto que es la distancia más directa (178). Además, es idéntica a la distancia D_A de Nei *et al.*, lo que la hace especialmente apropiada para el análisis filogenético con marcadores VNTR (182,183). Una vez calculadas las distancias se

⁸ La dirección web de esta plataforma es: www.miru-vntrplus.org. Toda la información acerca de su uso está recogida en su manual (177) y en los artículos citados en el texto.

construyeron árboles de expansión mínima (*Minimum Spanning Tree - MST*), utilizando tres tipos de umbral basados en el número máximo de *loci* diferentes entre cepas: como máximo dos, como máximo uno o sin diferencia (es decir, con idéntico mirutipo). Los MST obtenidos mediante MIRU-VNTR_{plus} se completaron utilizando el programa de vectores gráficos Inkscape versión 0.92 para Windows. Posteriormente, los distintos MST generados se compararon entre ellos.

Se describieron los casos de los distintos complejos clonales detectados en busca de posibles relaciones epidemiológicas, así como los patrones de sensibilidad dentro de cada uno de ellos.

Otros dos aspectos estudiados, aunque con un bajo número de casos, fueron la variabilidad del genotipado MIRU-VNTR intra-paciente en función del tiempo y de la localización de la infección. En el primer caso se estudiaron cepas de un mismo paciente obtenidas en momentos diferentes. Y en el segundo, cepas obtenidas de localizaciones distintas intra-paciente con una diferencia de tiempo inferior a cuarenta días.

La asignación de linajes y sub-linajes mediante MIRU-VNTR 24 *loci* se realizó también con la plataforma MIRU-VNTR_{plus}, siguiendo las indicaciones de su manual (177) y de la bibliografía relacionada con esta base de datos (178,179). En primer lugar se realizó la asignación de linajes usando la búsqueda por similitud (*similarity search*) y en los casos no concluyentes, se utilizó el método de identificación basado en árboles filogenéticos (*tree-based identification*), ya sea por el método *Neighbor joining* (NJ) o UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) (178,179). Los árboles obtenidos se adaptaron empleando la herramienta *on-line* iTOL (184), la cual permite editarlos y crear anotaciones en ellos.

3.11.3 MIRU-VNTR de 15 *loci* y comparación respecto al de 24 *loci*

Una vez analizados los datos de MIRU-VNTR de 24 *loci*, la obtención del genotipado de 15 *loci* mediante la plataforma MIRU-VNTR_{plus} se obtuvo con esos mismos datos, excluyendo los resultados de los nueve *loci* auxiliares (comentados en el apartado anterior).

La presencia de complejos clonales detectados por MIRU-15 se estudió del mismo modo que se ha descrito anteriormente para el genotipado de 24 *loci*.

La comparación entre 15 y 24 *loci* se realizó estudiando los distintos MST generados y determinando el poder discriminatorio de ambas técnicas en función del umbral establecido, mediante el cálculo del índice discriminatorio de Hunter-Gaston (HGDI) (185).

3.12 Tipado de SNP para la asignación de linajes y sub-linajes

La asignación de linajes y sub-linajes mediante tipado de SNP se realizó por HRM en las cepas no secuenciadas y mediante análisis *in silico* en aquéllas que sí lo fueron.

3.12.1 High Resolution Melting (HRM)

El análisis de alta resolución de fusión, en inglés *High Resolution Melting*, es una técnica de biología molecular que se lleva a cabo tras una amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR a tiempo real. Está basada en la desnaturalización del ADN de doble cadena (ADN_{dc}) y en el estudio y comparación de las curvas de fusión o *melting* generadas. Su principal aplicación es la detección de polimorfismos por diferencias en las temperaturas de fusión de cada amplificado.

El fundamento de esta técnica es la disociación del ADN_{dc} , proceso denominado fusión. Consta de dos etapas. En una primera etapa se realiza una amplificación en presencia de un fluorocromo que se une solo al ADN_{dc} produciendo una fuerte fluorescencia al intercalarse con éste. Sin embargo, el fluorocromo no interactúa con el ADN de cadena sencilla (ADN_{sc}), con lo cual no produce fluorescencia. Durante la amplificación se generan fragmentos de ADN_{dc} de forma exponencial, los cuales son medidos por la fluorescencia producida (Figura 39).

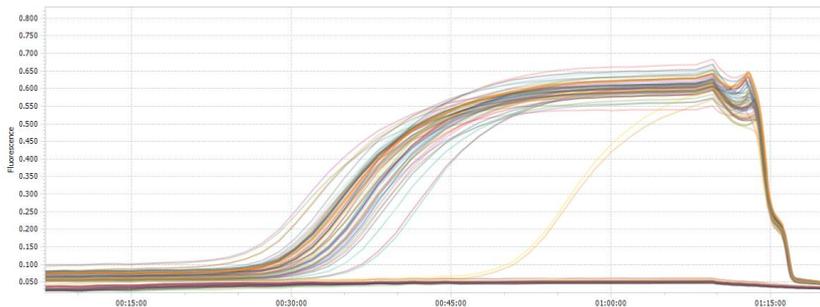


Figura 39. Diagrama de la fluorescencia generada por cada muestra en función del tiempo durante un ensayo de HRM.

La primera parte de la gráfica corresponde con la PCR, donde la fluorescencia de cada muestra se incrementa con el tiempo, al aumentar el número de ciclos de PCR. En la segunda etapa se realiza la desnaturalización progresiva de los fragmentos de ADN_{dc} mediante un incremento gradual de la temperatura, observándose una disminución de la fluorescencia al disociarse el ADN en cadenas sencillas. Obtenida con el programa *LightCycler*® 96 *Application Software*.

En una segunda etapa, el producto de la PCR es sometido a temperaturas progresivamente crecientes, permitiendo una desnaturalización gradual del ADN_{dc} . La disociación de la doble cadena permite la liberación del fluorocromo con el consiguiente descenso de la fluorescencia (Figura 39).

Dicho descenso se mide continuamente y se representa en función del aumento de la temperatura, obteniendo las denominadas curvas de fusión (Figura 40).

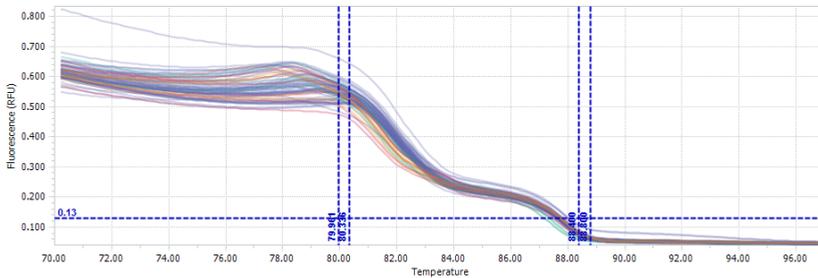


Figura 40. Gráfica de curvas de fusión obtenida mediante HRM. En ella se representa la fluorescencia generada por cada muestra en función de la temperatura. Obtenida con el programa *LightCycler® 96 Application Software*.

El comportamiento de fusión observado es característico de cada muestra de ADN particular. Esto se debe a que las mutaciones en los productos de PCR son detectables porque modifican la temperatura de fusión (T_m), según se muestra en la Tabla 15. Esta modificación de la T_m conlleva cambios en la forma o la ubicación de la curva de fusión. Comparando la muestra mutante con una muestra de tipo salvaje de referencia, estos cambios son fácilmente identificables. En nuestro caso se utilizó para comparar los polimorfismos marcadores de los distintos linajes y sub-linajes del MTBC, para permitir la tipificación de cepas.

Tabla 15. Clases de SNP y cambios típicos de la temperatura de fusión (T_m).

Clase SNP	Base cambiada	Cambio típico de T_m
1	C/T y G/A	aprox. 1,0°C
2	C/A y G/T	aprox. 1,0°C
3	C/G	0,2 a 0,5°C
4	A/T	< 0,2°C

El HRM también se emplea para detectar variaciones genéticas desconocidas como SNP, mutaciones o metilación.

3.12.1.1 Procedimiento

Se realizó la técnica de HRM aplicada a la tipificación de linajes y sub-linajes del MTBC descrita por Irving *et al.* (pendiente de publicar), basada a su vez en los marcadores de SNP publicados por Stucki *et al.* (186). Mediante esta técnica se estudiaron todas las cepas tipadas mediante MIRU-VNTR, pero no secuenciadas, para comprobar la asignación de linajes y sub-linajes.

En primer lugar, se realizó la identificación de los principales linajes del MTBC. Los linajes 2, 3 y 4 se estudiaron con una PCR múltiple (Tabla 16), los linajes 1 y 6 mediante una PCR dúplex (Tabla 17) y el linaje 5 y *M. bovis* empleando PCR simples (Tabla 18). La combinación de los distintos linajes se

Metodología

estableció basándose en las curvas de fusión observadas en los ensayos por PCR simple, según Irving *et al.* Cada una de las distintas reacciones se realizaron con 5 µl de una mezcla comercial (2x) específica para HRM (*Kapa HRM Fast qPCR Kit*, Kapa Biosystems) que incluye como fluorocromo EvaGreen®, además de dNTPs y la enzima polimerasa. También se añadió 1 µl de MgCl₂ a 25 mM y la mezcla de cebadores directo e inverso a una concentración de 10 mM. Para los linajes 1, 2, 3, 5, 6 y *M. bovis* se añadió 0,2 µl de la mezcla de cebadores y 0,6 µl para el linaje 4. La cantidad de ADN ensayada fue de 1 µl a una concentración de 1 ng/µl. El volumen final de todas las reacciones fue de 10 µl el cual se ajustó con agua grado biología molecular.

Tabla 16. Volúmenes de reactivos empleados en la PCR múltiple para los linajes 2, 3 y 4 de MTBC mediante HRM.

Reactivos PCR múltiple L2, L3 y L4	Volumen (µl) 1x
<i>Master mix</i> KAPA (2x)	5,0
MgCl ₂ (25 mM)	1,0
Cebador directo e inverso (10 µM) L2	0,2
Cebador directo e inverso (10 µM) L3	0,2
Cebador directo e inverso (10 µM) L4	0,6
H ₂ O	2,0
ADN (1 ng/µl)	1,0
TOTAL	10,0

Tabla 17. Volúmenes de reactivos empleados en la PCR dúplex para los linajes 1 y 6 de MTBC mediante HRM.

Reactivos PCR dúplex L1 y L6	Volumen (µl) 1x
<i>Master mix</i> KAPA (2x)	5,0
MgCl ₂ (25 mM)	1,0
Cebador directo e inverso (10 µM) L1	0,2
Cebador directo e inverso (10 µM) L6	0,2
H ₂ O	2,6
ADN (1 ng/µl)	1,0
TOTAL	10,0

Tabla 18. Volúmenes de reactivos empleados en las PCR simples para el linaje 5 o *M. bovis* mediante HRM.

Reactivos PCR simple	Volumen (µl) 1x
<i>Master mix</i> KAPA (2x)	5,0
MgCl ₂ (25 mM)	1,0
Cebador directo e inverso (10 µM)	0,2
H ₂ O	2,8
ADN (1 ng/µl)	1,0
TOTAL	10,0

Una vez obtenidos los linajes principales se estudiaron las cepas pertenecientes al L4 para la asignación de sub-linajes. Los sub-linajes 4.3 (LAM) y 4.10 (PGG3) se ensayaron mediante una PCR dúplex (Tabla 19), mientras que los sub-linajes 4.1.1 (X), 4.1.2 (Haarlem), 4.1.3 (Ghana), 4.2 (Ural), 4.4, 4.5, 4.6.1 (Uganda) y 4.6.2 (Cameroon) se tiparon mediante reacciones individuales (Tabla 20). También descritas por Irving *et al.*

Tabla 19. Volúmenes de reactivos empleados en la PCR dúplex para los sub-linajes 4.3 (LAM) y 4.10 (PGG3) mediante HRM.

Reactivos PCR dúplex LAM y PGG3	Volumen (µl) 1x
Master mix KAPA (2x)	5,0
MgCl ₂ (25 mM)	1,0
Cebador directo e inverso (10 µM) LAM	0,4
Cebador directo e inverso (10 µM) PGG3	0,4
H ₂ O	2,2
ADN (1 ng/µl)	1,0
TOTAL	10,0

Tabla 20. Volúmenes de reactivos empleados en las PCR simples para los sub-linajes 4.1.1 (X), 4.1.2 (Haarlem), 4.1.3 (Ghana), 4.2 (Ural), 4.4, 4.5, 4.6.1 (Uganda) y 4.6.2 (Cameroon) mediante HRM.

Reactivos PCR simple sub-linajes	Volumen (µl) 1x
Master mix KAPA (2x)	5,0
MgCl ₂ (25 mM)	1,0
Cebador directo e inverso (10 µM)	0,4
H ₂ O	2,6
ADN (1 ng/µl)	1,0
TOTAL	10,0

Las condiciones de la reacción, detalladas en la Tabla 21, fueron las mismas en todos los casos. El ensayo se realizó con el equipo *Light Cycler 96*[®] (Roche Molecular Systems, Inc.). Cada tanda se realizó siempre con controles positivos de los linajes/sub-linajes a estudiar y un control negativo (agua grado biología molecular). Además, se incorporaron muestras con linajes conocidos distintos de los estudiados, para poder discriminar mejor. Todas las muestras se ensayaron por duplicado.

Tabla 21. Condiciones de la PCR para el tipado de linajes/sub-linajes del MTBC mediante HRM. Abreviaturas: Temp. - temperatura; lect. - lecturas.

Etapas	Temp.	Tiempo	Lectura	Ciclos	Rampa
Desnaturalización inicial	95°C	5'	No	1	-
Amplificación	95°C	10''	No	40	-
	57°C	20''	No		-
	72°C	20''	Simple		-
HRM	97°C	5''	No	1	4,4°C/s
	70°C	60''	No		2,2°C/s
	97°C	1''	Continua		25 lect./s

3.12.1.2 *Análisis de las curvas de fusión*

Una vez realizado el ensayo HRM, los resultados obtenidos se estudiaron mediante el programa *LightCycler® 96 Application Software* versión 1.1.0.1320 (Roche Diagnostics International Ltd). Con este programa se analizaron y compararon las curvas de fusión obtenidas, para asignar los linajes/sub-linajes en función de la forma de la curva, tomando como referencia los controles positivos de cada linaje estudiado.

El proceso de análisis de los datos obtenidos consta de seis etapas. En primer lugar, se comprobó mediante la lectura de las curvas de PCR (Figura 39) que todas las muestras hubiesen amplificado y que no lo hubiese hecho el control negativo. Todas las muestras negativas se excluyeron antes de realizar el análisis HRM. En segundo lugar, se compararon entre sí las réplicas de cada muestra para comprobar que hubiesen amplificado correctamente. En tercer lugar, se realizó el análisis HRM integrado dentro del programa, obteniendo las curvas de fusión (Figura 40). En cuarto lugar, se normalizaron las diferencias de fluorescencia entre las muestras de estas curvas seleccionando una región antes y después de la desnaturalización de éstas. Con lo que las señales de fusión previas se establecieron de manera uniforme en un valor relativo del 100%, mientras que las señales de fusión posteriores se establecieron en un valor relativo del 0%. Esto permitió la normalización de la fluorescencia inicial y final en todas las muestras facilitando la interpretación y el análisis de los datos. Tras la normalización, en quinto lugar, se representaron las muestras empleando distintos tipos de gráficas, como son las curvas de fusión normalizadas (Figura 41), los picos de fusión normalizados (Figura 42), la gráfica de diferencias o los mapas de calor (Figura 43). Las más empleadas fueron las dos últimas. El mapa de calor representa la placa en la que ha tenido lugar el ensayo y el código de colores hace referencia a los linajes/sub-linajes asignados mediante la gráfica de diferencias. Dicha gráfica permite analizar más a fondo las diferencias en la forma de la curva de fusión al restar una curva de referencia, en nuestro caso los controles pertenecientes a linajes distintos de los estudiados. Esto facilita la agrupación muestras que tienen curvas de fusión similares y, por tanto, que pertenecen a un mismo

linaje/sub-linaje. Lo que nos llevaría en sexto y último lugar, a la asignación de linajes y sub-linajes.

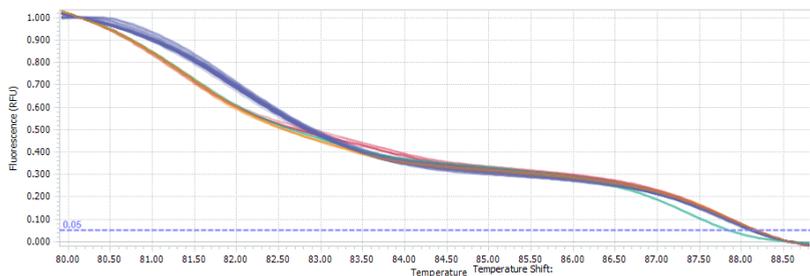


Figura 41. Curvas de fusión normalizadas.

La normalización de la fluorescencia inicial y final en todas las muestras facilita la interpretación y el análisis de los datos. Obtenida del programa *LightCycler® 96 Application Software*.

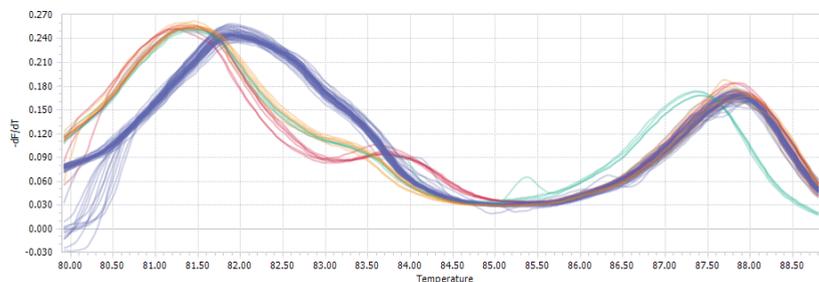


Figura 42. Picos de fusión normalizados.

Representan la primera derivada negativa de las curvas de fusión normalizadas. Permiten visualizar el rango de temperatura de fusión de cada muestra como un pico, facilitando la discriminación de grupos complejos. Obtenida del programa *LightCycler® 96 Application Software*.

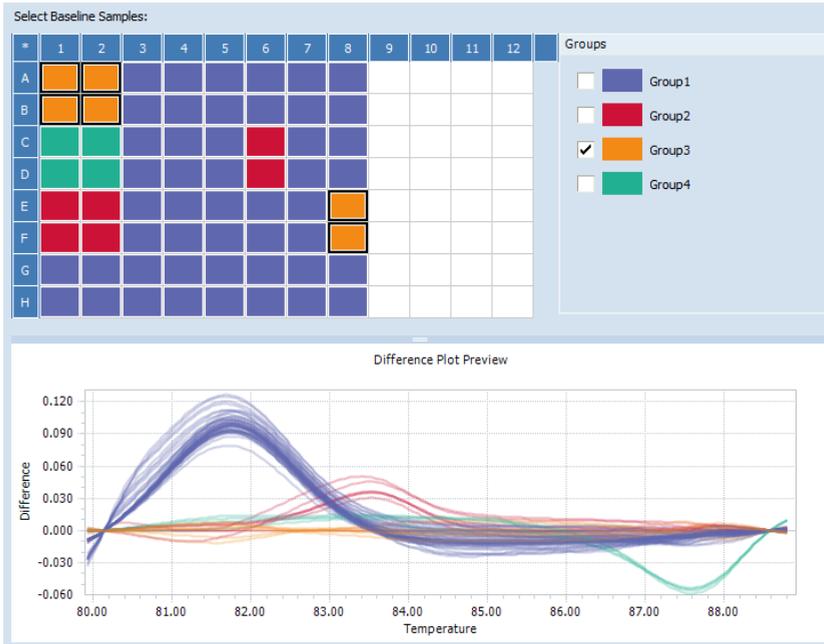


Figura 43. Mapa de calor (parte superior) y gráfica de diferencias (parte inferior). Ambas gráficas pertenecen a un ensayo de HRM múltiple para la identificación de los linajes 2 (verde), 3 (rojo) y 4 (morado). Todas las muestras incluyendo los controles se analizaron por duplicado. Se emplearon controles del linaje 2 (C1=D1 y C2=D2), del linaje 3 (E1=F1 y E2=F2), del linaje 4 (G1=H1 y G2=H2) y como control negativo respecto a estos linajes estudiados se emplearon cepas del linaje 1 (A1=B1 y A2=B2, en color amarillo). El resto de los pocillos de la columna 3 a la 8 son muestras. Todas ellas se asignaron al linaje 4, excepto la muestra C6=D6 que fue un L3 (CHGUV055) y E8=F8 (CHGUV075) que no se asignó a ninguno de los linajes estudiados (L2, L3 ni L4). Esta última muestra se estudió posteriormente (dúplex L1 y L6) y se tipo como L1. Figura obtenida del programa *LightCycler® 96 Application Software*.

3.12.2 Secuenciación de genoma completo (WGS)

La secuenciación del genoma completo del MTBC permite la asignación de linajes y sub-linajes, como se ha descrito previamente en la literatura (41,42,66,67,187,188). La metodología de la WGS se describe más adelante, en el apartado 3.13.

Una vez obtenidos los datos de secuenciación, la asignación *in silico* de los linajes se llevó a cabo empleando los marcadores de SNP descritos por Coll *et al.* (42) y para los sub-linajes dentro del linaje 4 los de Stucki *et al.* (41).

La distribución de los distintos linajes/sub-linajes encontrados se representaron mediante un árbol filogenético obtenido a partir de los datos de secuenciación, empleando el método *Neighbor Joining*.

3.12.3 Comparación del tipado de SNP respecto a la técnica MIRU-VNTR

Esta comparación se realizó mediante el empleo de árboles filogenéticos a partir de los resultados obtenidos del genotipado MIRU-VNTR 24 *loci* y el tipado de SNP mediante HRM y WGS. En primer lugar, se evaluó la tipificación de linajes mediante MIRU-VNTR 24 *loci* respecto al tipado de SNP *in silico* tras secuenciación. En segundo lugar, se comparó la asignación de linajes MIRU-VNTR 24 *loci* respecto al tipado de SNP por HRM. Y en tercer y último lugar, se evaluó de forma conjunta la asignación de linajes/sub-linajes mediante MIRU respecto al tipado de SNP (HRM y WGS).

3.12.4 Análisis de variables en función de los linajes encontrados

Se estudiaron una serie de variables en función de los linajes asignados por tipado de SNP en las cepas estudiadas, las cuales fueron: la frecuencia de cada linaje/sub-linaje, las variables demográficas edad y género, la distribución geográfica y la forma de presentación de la enfermedad tuberculosa.

3.13 Secuenciación de genoma completo (WGS)

La secuenciación no se pudo realizar en todas las cepas del estudio debido a motivos económicos, pero sí se hizo en las cepas aisladas entre los años 2013 y 2015, al estar incluidas en el convenio del Grupo de Trabajo de la Tuberculosis de la Comunidad Valenciana. En el cual, las cepas clínicas del MTBC aisladas en los distintos centros de la Comunidad Valenciana se estudian mediante secuenciación de genoma completo de forma rutinaria. La secuenciación se realiza en el laboratorio de bioseguridad de nivel 3 de la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO) y la Unidad Genómica de la Tuberculosis del Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC), ambos dirigidos por el Dr. Iñaki Comas. Posteriormente, también se pudo secuenciar alguna cepa más, al ser considerada interesante desde el punto de vista epidemiológico.

3.13.1 Procedimiento

El paso previo a la secuenciación del ADN, previamente extraído y purificado, fue la generación de las librerías de ADN. Esta etapa se realizó empleando el kit comercial Nextera XT (Illumina, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez generadas, se secuenciaron con el kit de secuenciación *MiSeq Reagent* kit v3 (Illumina, Inc.) en la plataforma de secuenciación MiSeq® (Illumina, Inc.) empleando la tecnología *paired-end*. Esta tecnología permite la secuenciación de un fragmento por ambos extremos obteniendo lecturas apareadas, lo que facilitará el alineamiento (véase el siguiente apartado).

3.13.2 Análisis bioinformático

Las lecturas de secuenciación de extremos apareados (*paired-end*) generadas se ajustaron con Trimmomatic (189). El mapeo y la detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) se realizó siguiendo el *pipeline* descrito previamente por Comas *et al.* (2). En el cual, las lecturas se mapearon y se alinearon con un genoma inferido del ancestro del MTBC más probable (2,41) utilizando BWA (190). Se generó un archivo en formato *pileup* utilizando SAMtools (191) y se procesó con VarScan (192) para la detección de variantes (*variant calling*). Este paso consiste en la comparación de las lecturas alineadas con el genoma de referencia, buscando aquellas posiciones donde exista una discrepancia entre la lectura y el genoma de referencia (*mismatch*). En caso de encontrar suficientes lecturas con el mismo *mismatch*, que permitan descartar posibles errores de secuenciación o de alineamiento, este *mismatch* se reporta como una variante. Las variantes van acompañadas de una frecuencia alélica (VAF, *Variant Allele Frequency*), que se corresponde con el porcentaje en el que aparece la variante respecto de la cobertura total de esa base. Posteriormente, se separaron las variantes en INDELS (pequeñas inserciones y deleciones) y en SNP. Los polimorfismos individuales con al menos 10 lecturas en ambas cadenas y una puntuación de calidad de 20 se seleccionaron y clasificaron en dos categorías según su frecuencia alélica. Por

un lado, los SNP fijados, cuando están presentes en una frecuencia no inferior al 90%. Y, por otro lado, los SNP con frecuencias que oscilan entre el 10 y el 89%, clasificados como SNP de baja frecuencia. Se consideró un INDEL si la mutación estaba presente con una cobertura profunda mínima de 10x. La aplicación SnpEff (193) se utilizó para la anotación de SNP utilizando la referencia de anotación H37Rv (AL123456.2). Finalmente, se eliminaron del análisis los SNP anotados en regiones difíciles de mapear, como las secuencias repetitivas y los genes PPE / PE-PGRS, así como los detectados cerca de INDELS (2).

3.13.3 Epidemiología molecular

El estudio epidemiológico molecular fue realizado también por el grupo del Dr. Iñaki Comas a partir de los datos obtenidos mediante secuenciación. Para ello se llevó a cabo el cálculo de las distancias genéticas existentes entre pares de aislados (*pairwise*) con SNP fijados, sin tener en cuenta en un primer momento las regiones determinantes de resistencia. El resultado obtenido fue el número de SNP diferentes entre cada par de cepas. Posteriormente, para conocer si dos cepas estaban relacionadas, indicativo de que pudo haber transmisión reciente entre pacientes, se empleó un umbral de como máximo quince SNP de diferencia. Las cepas que cumplían este criterio eran consideradas casos agrupados. Por otro lado, si la diferencia era superior a quince SNP significaba que muy probablemente no hubo transmisión entre los pacientes portadores de dichas cepas, siendo considerados casos únicos. Además, los casos agrupados se subclasificaron según la probabilidad de que se hubiese producido la transmisión en función del número de SNP diferentes, descrito en la Tabla 22.

Tabla 22. Clasificación de la probabilidad de la transmisión en función de la diferencia de SNP. Criterios establecidos y empleados por el grupo del Dr. Iñaki Comas para el establecimiento de patrones agrupados y únicos mediante WGS.

Diferencia de SNP	Clasificación de la transmisión
≤ 5	Muy probable
6 - 9	Probable
10 - 15	Poco probable
>15	Único / No transmisión

Puede ocurrir que dos cepas relacionadas epidemiológicamente, difieran además en su patrón de sensibilidad frente a los antituberculosos, porque una de ellas haya adquirido un SNP determinante de resistencia. Aunque en un primer momento dicho SNP no se tiene en cuenta, posteriormente sí, sumándose a la diferencia de SNP previamente calculada.

3.13.4 Asignación de linajes y sub-linajes

Visto en el apartado 3.12.2.

3.13.5 Predicción de la sensibilidad frente a los antituberculosos

Visto en el apartado 3.10.2.2.

3.13.6 Comparación del poder discriminatorio de la WGS respecto a MIRU-VNTR

Ambas metodologías se compararon mediante árboles filogenéticos y árboles de mínima expansión, para poder identificar los complejos clonales. En la técnica MIRU se tuvo en cuenta el empleo de tres posibles umbrales: como máximo 2 *loci* de diferencia, como máximo 1 *locus* y sin diferencia.

El poder discriminatorio de las dos metodologías se calculó mediante el índice discriminatorio de Hunter-Gaston (HGDI) (185).

También se estudiaron las diferencias de SNP mediante WGS respecto a los *loci* diferentes mediante MIRU-VNTR 24, para cada una de las cepas estudiadas.

3.14 Análisis estadístico

El análisis estadístico realizado en este estudio se basó en la medida de la asociación entre variables. Posteriormente, una vez observada la existencia de asociación, se contrastó si dicha relación era estadísticamente significativa o no. Las pruebas de asociación y de significatividad estadística empleadas se detallan en la Tabla 23, en función de los tipos de variables analizadas.

Tabla 23. Pruebas estadísticas empleadas en el estudio en función del tipo de variables.

Tipos de variables	Pruebas de asociación	Pruebas de significatividad
Dos categóricas		
Nominal	Coficiente de contingencia de Cramer (V de Cramer)	Tabla contingencia
Ordinal	Tau-b de Kendal	Chi cuadrado (χ^2)
Categórica y Cuantitativa		
La v. categórica es dicotómica	d de Cohen	t de Student-Fisher Si cumple la normalidad ¹ y la igualdad de varianzas ²
		U de Mann-Whitney Si no cumple la normalidad ¹ o la igualdad de varianzas ²
La v. categórica tiene más de dos valores	f de Cohen	ANOVA Si cumple la normalidad ¹ y la igualdad de varianzas ²
		Kruskal-Wallis Si no cumple la normalidad ¹ o la igualdad de varianzas ²
Dos cuantitativas	Coficiente de correlación Pearson o Spearman.	Coficiente de correlación Pearson o Spearman.

¹Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. ²Prueba de igualdad de varianzas de Levene.

La base de datos de las variables recogidas en este trabajo se realizó con el programa Microsoft Excel 2013. Las pruebas de asociación y significación

estadística de la Tabla 23 se calcularon mediante el programa informático IBM SPSS Statistics versión 20, salvo las pruebas de Cohen en las que se empleó el programa G*Power versión 3.1.9.2. de la Universidad de Dusseldorf.

3.15 Aceptación por la Comisión de Investigación y el Comité Ético de Investigación Clínica

Este estudio ha sido evaluado y aceptado por la Comisión de Investigación (noviembre de 2014) y el Comité Ético de Investigación Clínica (marzo de 2015) del CHGUV. Las cepas se obtuvieron del estudio microbiológico de tuberculosis realizado de rutina sobre muestras clínicas, por solicitud del médico responsable de cada paciente. La necesidad de obtener un consentimiento informado no se aplicó por la razón anterior y porque se trabajó con cepas, cuyos pacientes de origen fueron seudonimizados.

3.16 Financiación

La financiación del proyecto se llevó a cabo gracias a la concesión de una de las becas López-Trigo de promoción de la investigación en el CHGUV para el ejercicio 2014, concedida en marzo de 2015.

Metodología

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados y Discusión

4.1 Aislados estudiados

Se extrajeron los datos de las cepas del MTBC aisladas durante el año 2009 y 2010 del sistema informático de laboratorio (GestLab®, Cointec), obteniendo 282 cepas (Figura 44). Este número se cribó dejando sólo una cepa por paciente, quedando 121 cepas, de las cuales 26 no estuvieron disponibles en el cepario o no fueron viables tras la descongelación. Posteriormente, se incluyeron cuatro cepas de pacientes duplicados obtenidas de muestras diferentes y/u obtenidas en momentos distintos (seleccionadas aleatoriamente de entre las 161 excluidas previamente, cuya finalidad se explica más adelante). También se incluyeron cuatro cepas aisladas en 2011, debido a que dos de ellas pertenecían a un mismo paciente obtenidas de localizaciones anatómicas distintas y otra pertenecía a un paciente relacionado epidemiológicamente con el anterior.

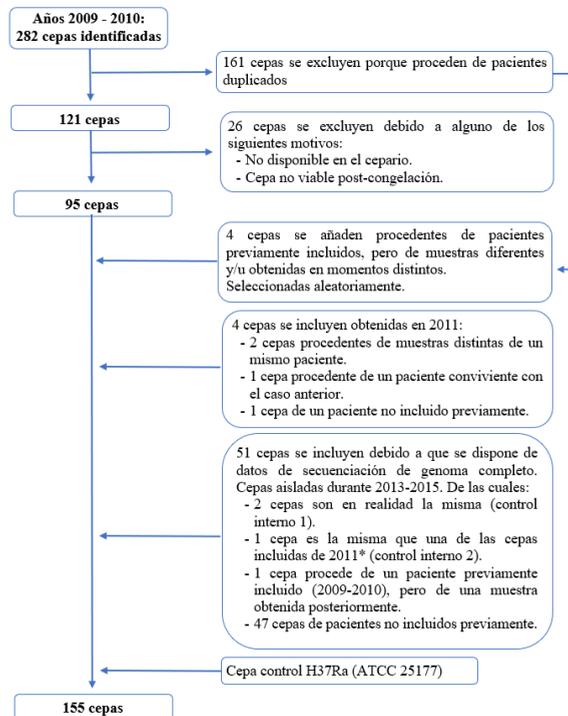


Figura 44. Diagrama de flujo de la selección de las cepas estudiadas.

*Cepa aislada en 2011, pero secuenciada posteriormente.

Con la finalidad de comparar la técnica MIRU-VNTR con datos obtenidos mediante secuenciación de genoma completo (WGS) se incorporaron 51 cepas, para las que se disponía de dicha información. Las peculiaridades de algunas de estas cepas se detallan en la Figura 44.

Cabe indicar que de las 95 cepas aisladas entre los años 2009-2010, cuatro de ellas se secuenciaron *a posteriori*, debido a que estaban incluidas en un complejo clonal que continuaba activo en el año 2015.

Finalmente, se incluyó la cepa de *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177) como cepa de control, debido a que el tipado de esta cepa mediante la técnica MIRU-VNTR de 24 *loci* era conocido de antemano.

La incorporación de cepas y pacientes duplicados se realizó por un lado para tener controles internos y, por otro, para observar la posible microevolución de las cepas intrapaciente, en función de la localización de la infección y del tiempo.

4.2 Descripción de la muestra de pacientes origen de las cepas estudiadas

En este apartado se verá conjuntamente tanto el análisis descriptivo de las variables utilizadas en el estudio, que trata de dar una visión global de los resultados obtenidos en la investigación, como el análisis inferencial, el cual pretende recoger las posibles relaciones existentes entre las variables estudiadas. Para los distintos análisis de este apartado se excluyó la cepa control empleada, dejando el número total de cepas en 154.

4.2.1 Datos demográficos

4.2.1.1 Género y grupos de edad

Los aislados clínicos procedían de pacientes de ambos sexos, aunque dos terceras partes de las muestras pertenecieron a hombres (Figura 45). En un caso el género del paciente no figuraba en la historia clínica.

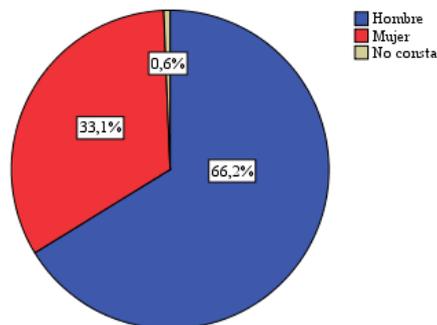


Figura 45. Distribución por género de los pacientes.

La Figura 46 muestra la distribución por género en función del año de aislamiento. En ella se observa que las diferencias por género se mantienen en todos los años salvo en 2011 y 2013, cuyas muestras son exclusivamente de hombres. No obstante, el número de éstas es bajo (4 y 3, respectivamente).

La edad media de los pacientes fue de 43 años y la mediana de 39 años. La edad mínima fue de 0 años y la máxima de 90 años. En un caso de 2009 la edad del paciente no figuraba en la historia clínica.

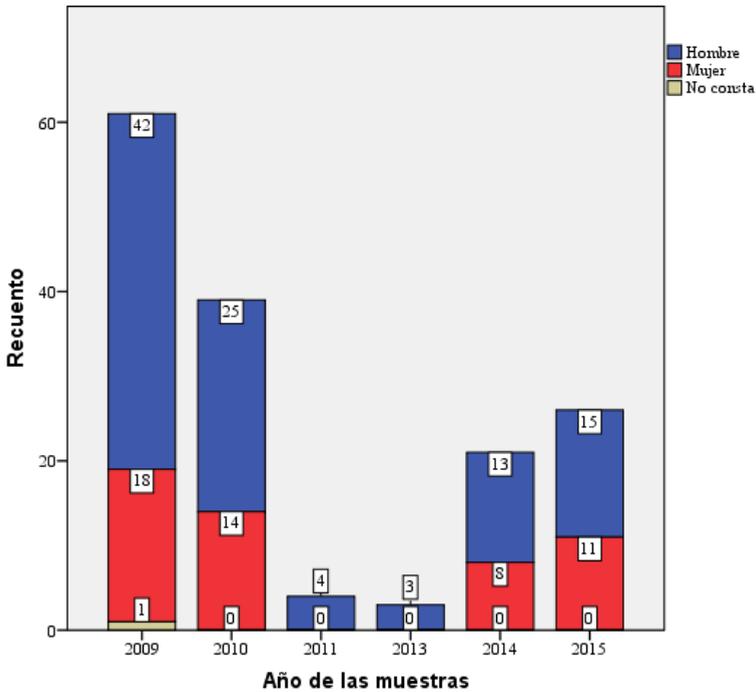


Figura 46. Distribución por género en función del año de aislamiento. Los valores que aparecen en el gráfico son frecuencias absolutas.

La distribución de pacientes por intervalos de edad (Figura 47) mostró un predominio de los grupos etarios correspondientes al intervalo de 31-35 años (15,7%) seguido del de 36-40 años (14,2%). Más de la mitad de los pacientes presentaron una edad comprendida entre los 26 y 45 años (51,1%).

En cuanto a las edades extremas, seis muestras procedían de pacientes pediátricos, todos ellos menores de 5 años (3,9%). Dos de ellas procedentes del mismo paciente. En el otro extremo, el 10,5% presentaba más de 75 años (16 casos).

Resultados y Discusión

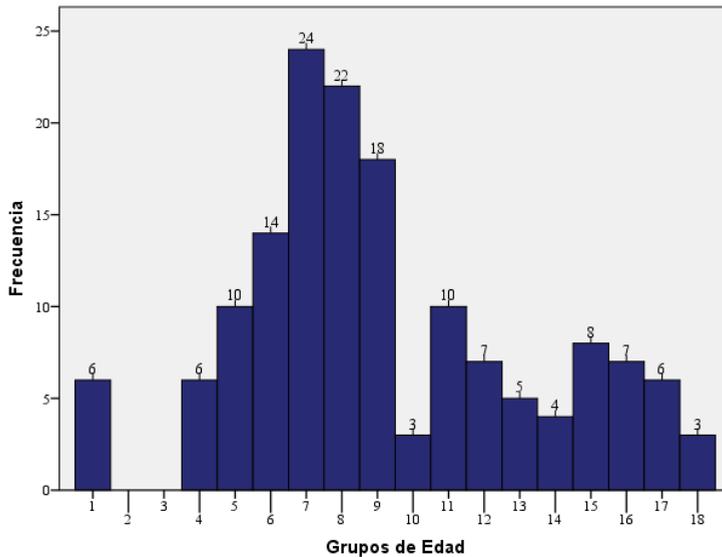


Figura 47. Distribución por intervalos de edad de los pacientes.

Los valores que aparecen en el gráfico son frecuencias absolutas. Leyenda de los grupos de edad: 1 = ≤ 5 años; 2 = 6-10 años; 3 = 11-15 años; 4 = 16-20 años; 5 = 21-25 años; 6 = 26-30 años; 7 = 31-35 años; 8 = 36-40 años; 9 = 41-45 años; 10 = 46-50 años; 11 = 51-55 años; 12 = 56-60 años; 13 = 61-65 años; 14 = 66-70 años; 15 = 71-75 años; 16 = 76-80 años; 17 = 81-85 años; 18 = 86-90 años.

La distribución de edades en función del género se muestra en la Figura 48. Donde la media de edad fue de 39 años para las mujeres y 46 años para los hombres. La intensidad de la asociación entre ambas variables fue alta (tamaño del efecto 3,300) y se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,039$).

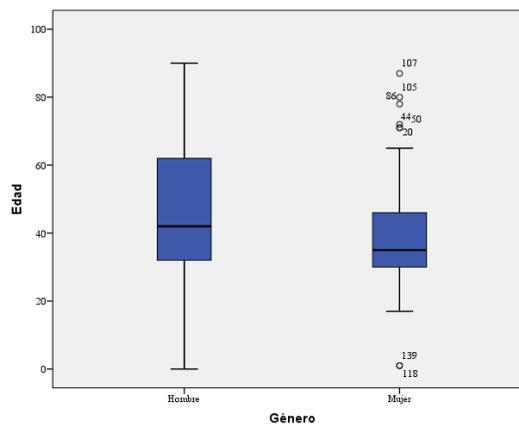


Figura 48. Diagrama de cajas con la distribución de edades por género.

La distribución por grupos etarios y género se representa en la Figura 49. En hombres, los grupos etarios con mayor número de casos fueron de 36 a 40 y de 41 a 45 años, ambos con 14 casos cada uno (13,7% respecto a los hombres y 9,2% respecto al total). Mientras que, en mujeres el grupo con mayor número de casos fue el intervalo de 31 a 35 años (23,5% respecto a las mujeres y 7,8% respecto al total).

Por lo que respecta a las edades extremas, en pacientes pediátricos hay 4 muestras que pertenecían a niños (dos de las cuales pertenecientes al mismo paciente) y 2 a niñas. En mayores de 75 años, 13 fueron hombres y 6 mujeres. En ambos casos se mantuvo la proporción 2:1 de hombres y mujeres.

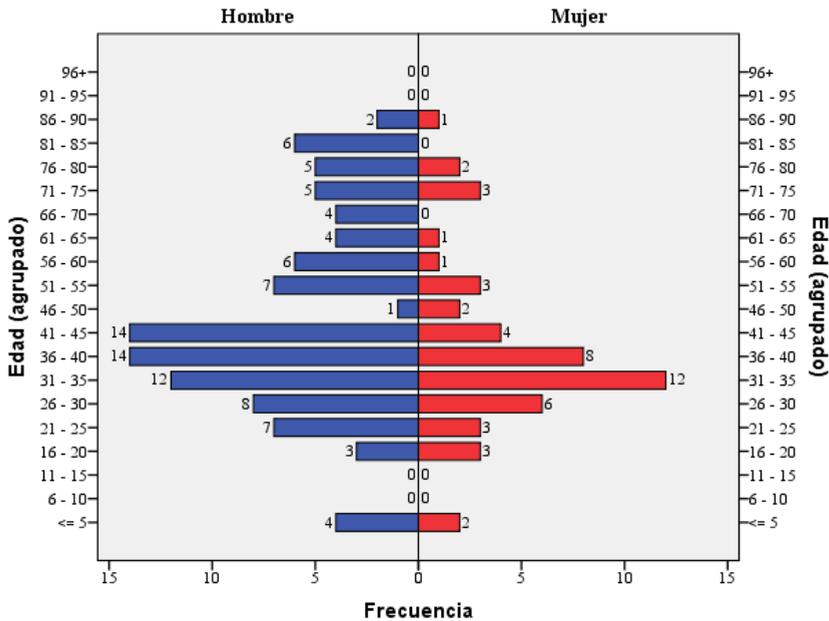


Figura 49. Distribución de edades en función del género. Los valores que aparecen en el gráfico son frecuencias absolutas.

4.2.1.2 País de origen

El 66,2% de los pacientes (n = 102) procedían de España y el 31,2% (n = 48) de otros países. En un 2,6% de los casos (n = 4) no figuraba su origen en la historia clínica.

Entre los pacientes procedentes de otros países distintos de España destacan los procedentes de América (América Central y del Sur) con 17 casos (35,4%), seguido de África con 15 (31,3%) y Europa del Este con 12 (25,0%). La distribución de los pacientes en función de su región de origen se muestra en la Figura 50 y la Figura 51.

Resultados y Discusión

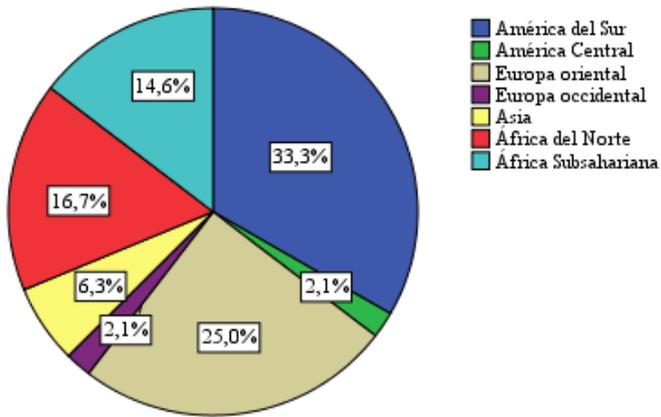


Figura 50. Diagrama de sectores con la distribución geográfica de los pacientes de origen no español.

Los países que aportaron un mayor número de casos fueron Rumanía (11; 22,9%), Marruecos (6; 12,5%), Bolivia (5; 10,4%), Colombia (4; 8,3%) y Senegal (4; 8,3%), que en conjunto suman el 62,4% de los casos en extranjeros (Figura 51).

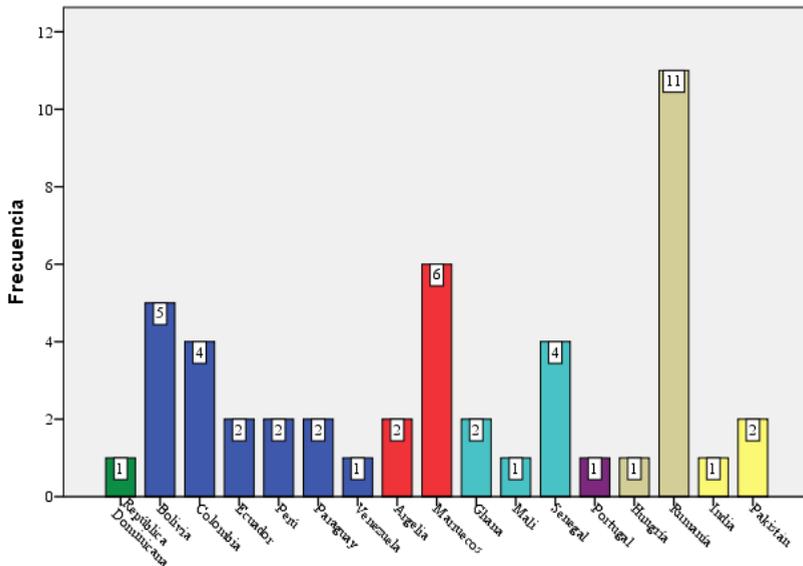


Figura 51. Diagrama de barras con la distribución por países de los pacientes de origen no español.

Los valores que aparecen en el gráfico son frecuencias absolutas. El código de colores de las barras coincide con el de la Figura 50.

El tiempo medio de estancia en España de estos pacientes fue de 6,0 años; calculado a partir de 37 pacientes (de los que se disponía de datos) de los 48

procedentes de otros países, desde su llegada a nuestro país hasta que se les realizó la toma de la muestra positiva. El tiempo mínimo fue de 0 años y el máximo de 14 años. Un 37,8% de los extranjeros fueron inmigrantes recientes (14/37), es decir, casos con estancia en España inferior a 5 años, representando el 9,1% de todos los casos estudiados.

Los casos en pacientes extranjeros tuvieron una media de edad de 32,7 años, inferior a la de los pacientes nacidos en España que fue de 49,0 años (Figura 52). La intensidad de la asociación entre ambas variables fue alta (tamaño del efecto 7,599) hallándose diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,001$).

Por lo que respecta a la distribución por género en función del origen de los casos, el porcentaje de hombres en pacientes extranjeros fue del 70,8%, mientras que en nacidos en España fue del 64,7%. El grado de dependencia entre estas dos variables fue bajo (V de Cramer = 0,061) y no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,458$).

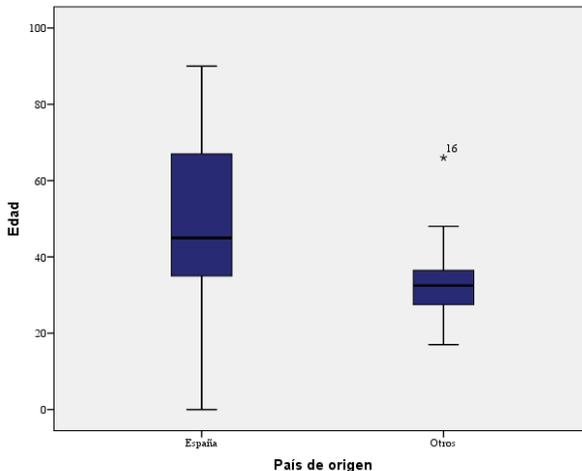


Figura 52. Diagrama de cajas con la distribución de edad entre pacientes nacidos en España o en otros países.

4.2.2 Datos epidemiológicos

4.2.2.1 Tipo de caso: autóctono o importado

El 98,0% de los casos ($n = 148$) fueron clasificados como autóctonos por Salud Pública y el 2,0% ($n = 3$) como importados (Figura 53). Tres casos no pudieron atribuirse a ninguna de estas dos variables debido a la falta de datos sobre su país de origen o al desconocimiento del tiempo de estancia en España (no mostrado en la Figura 53).

Resultados y Discusión

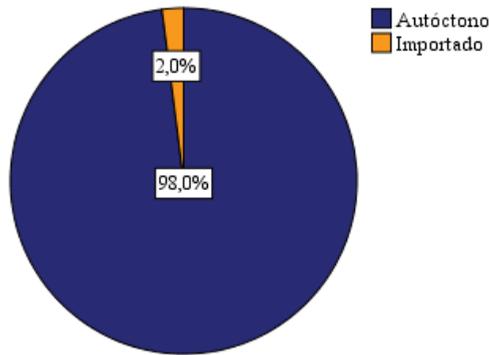


Figura 53. Clasificación del caso en autóctono o importado.

Por lo que respecta a los tres casos importados, los países de origen fueron Perú, Paraguay y Senegal. Dos de ellos eran mujeres y la edad en el momento de la toma de muestra fue de 17, 24 y 34 años. Debido al escaso número de casos importados no se realizó un análisis comparativo respecto a los casos autóctonos.

Dentro de los casos autóctonos diferenciaremos entre los pacientes nacidos en España y los nacidos en otros países (Figura 54). El 69,4% de los casos ($n = 102$) fueron españoles, mientras que el 30,6% ($n = 45$) fueron extranjeros. En un caso no se pudo establecer el origen del paciente; no obstante, Salud Pública lo tenía catalogado como autóctono (este dato no aparece en la Figura 54).

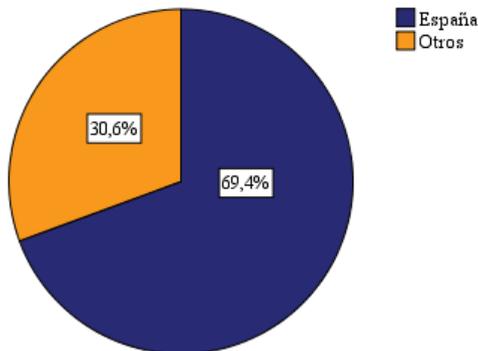


Figura 54. Clasificación de los casos autóctonos en función del país de origen.

La nacionalidad de los pacientes extranjeros englobados dentro de los casos autóctonos fue extrapolable a lo comentado en el apartado “Región de origen del paciente”, descontando los tres casos importados. Lo mismo ocurre con el análisis en función de la edad y del género.

4.2.2.2 Antecedentes de contacto

La información sobre el estudio de contactos se muestra en la Tabla 24. Ante todo, cabe destacar el importante número de casos en los que no se pudo recabar información acerca del estudio de contactos realizado por Salud Pública, los cuales representan más del 70%.

Considerando únicamente los casos de los que sí se dispone de datos (n = 44), el 70% de éstos tuvieron un antecedente de contacto previo con un enfermo de tuberculosis. De ellos, el 38,7% eran convivientes y el 19,4% familiares no convivientes. Con ese mismo porcentaje se encuentran las instituciones cerradas y los contactos para los que dicha relación no se especificó concretamente.

Tabla 24. Antecedente de contacto.

Antecedentes de contacto	n	%	n	%
No consta	110	71,4	-	-
No	13	8,4	13	29,5
Conviviente	12	7,8	12	27,3
Familiar no conviviente	6	3,9	6	13,6
Instituciones cerradas	6	3,9	6	13,6
Sí, pero no consta	6	3,9	6	13,6
Laboratorio	1	0,6	1	2,3
TOTAL	154	100	44	100

4.2.3 Datos microbiológicos

4.2.3.1 Año de aislamiento

Las cepas de MTBC objeto de este estudio fueron aisladas a partir de muestras clínicas de pacientes durante los años 2009-2011 y 2013-2015. En el primero de estos periodos las cepas se estudiaron únicamente mediante MIRU-VNTR (salvo alguna excepción que también se secuenció), mientras que en el segundo periodo se estudiaron también mediante secuenciación de genoma completo. La primera muestra se obtuvo el 04 marzo de 2009 y la última el 28 de diciembre de 2015. En la Figura 55 se observan claramente diferenciados los dos periodos indicados anteriormente. En el primero se incorporaron 104 muestras (67,5%), mientras que en el segundo fueron 50 (32,5%).

Como se observa en la Figura 56, 2009 fue el año en el que se incorporaron más muestras al estudio (61, 39,4%) y 2013 el que menos (3, 1,9%).

Resultados y Discusión

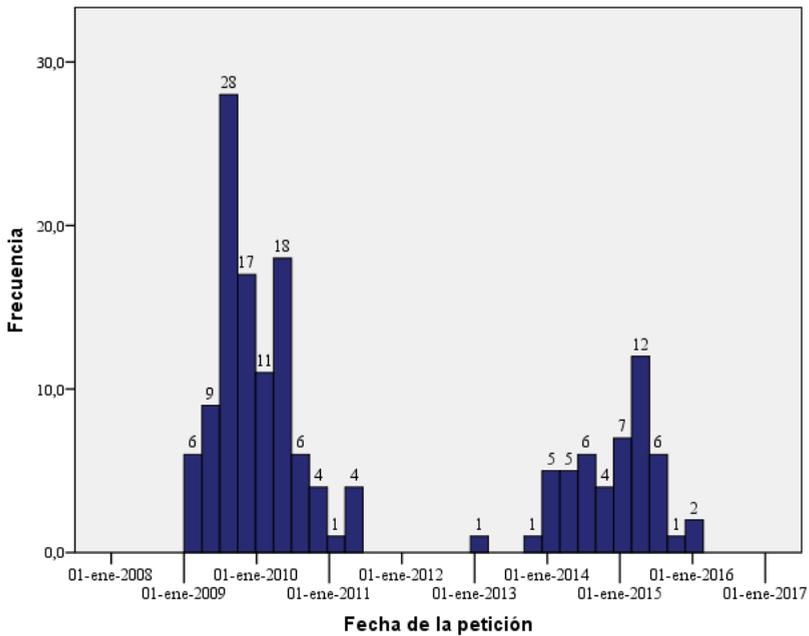


Figura 55. Representación cronológica basada en la fecha de obtención de las muestras de origen de las cepas estudiadas. Los valores que aparecen en el gráfico son frecuencias absolutas.

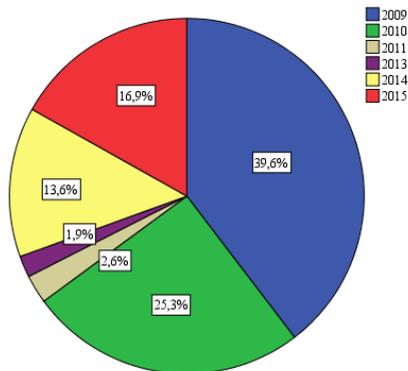


Figura 56. Distribución de las muestras de origen de las cepas estudiadas en función del año de obtención de éstas.

4.2.3.2 Procedencia de las peticiones

El origen de las peticiones representado en la Figura 57 muestra, de acuerdo con lo esperado, que el principal servicio peticionario fue Neumología con el 31,8% de las muestras remitidas ($n = 49$), seguido de la Unidad de

Enfermedades Infecciosas con el 14,3% (n = 22) y el servicio de Urgencias 11,0% (n = 17). Estos tres servicios fueron los responsables de más de la mitad de las peticiones. También se incluyeron 13 aislados procedentes del Hospital de Manises (8,4%). Por otro lado, en 10 casos (6,5%) no figuraba el origen del servicio peticionario.

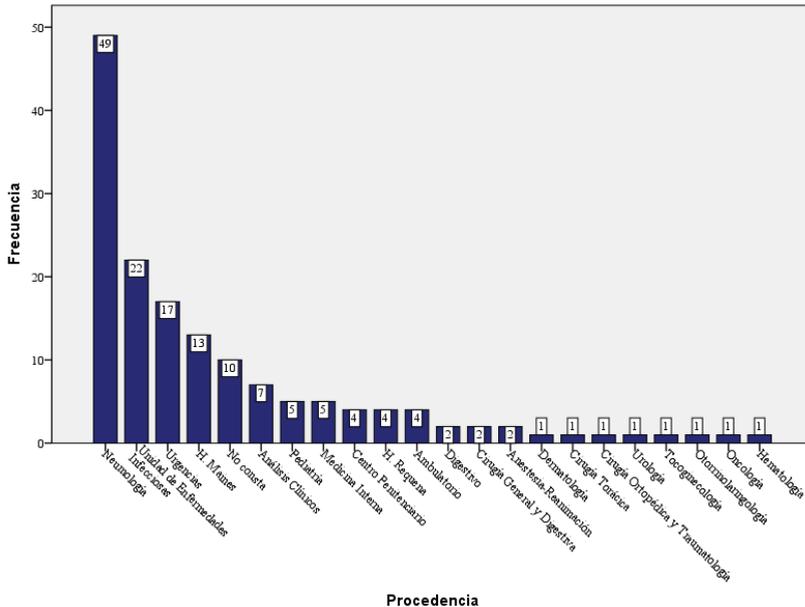


Figura 57. Diagrama de barras con la procedencia de las muestras de los aislados estudiados. Los valores que aparecen en el gráfico son frecuencias absolutas.

4.2.3.3 Tipos de muestras

Las muestras clínicas de origen respiratorio (esputo, esputo inducido, aspirado bronquial, lavado bronco-alveolar, absceso/biopsia pulmonar, jugo gástrico y líquido pleural) representaron el 80% (n = 123) de las muestras estudiadas; mientras que las de origen no respiratorio [absceso/biopsia de origen no pulmonar, líquidos estériles (excepto líquido pleural), muestras gastrointestinales (excepto jugo gástrico) y genitourinarias] solo el 20% (n = 31). Figura 58.

El tipo de muestra más frecuente fue el esputo, siendo el origen de los aislados estudiados en 79 ocasiones, lo que supuso el 64,2% de las muestras respiratorias y el 51,3% del total. Le siguió el aspirado bronquial con 19 muestras (15,5% de las respiratorias y 12,3% del total). La frecuencia de los distintos tipos de muestras estudiadas se puede observar en la Tabla 25.

Resultados y Discusión

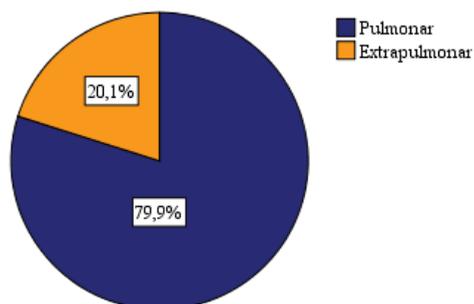


Figura 58. Origen de los tipos de muestras.

Tabla 25. Tipos de muestras clínicas a partir de las cuales se aislaron las cepas objeto de estudio.

Tipo de muestra	n	%
Respiratorias	123	79,9
Esputo	79	51,3
Esputo inducido	9	5,8
BAS	19	12,3
BAL	5	3,2
Biopsia pulmonar	1	0,6
Absceso/Biopsia pulmonar	1	0,6
Líquido pleural	3	1,9
Jugo gástrico	6	3,9
Abscesos/Biopsias	20	13,0
Biopsia	2	1,3
Absceso/Biopsia abdominal	1	0,6
Biopsia ganglio	5	3,2
Biopsia PAAF	5	3,2
Exudado herida profunda	1	0,6
Exudado quirúrgico profundo	2	1,3
Exudado úlcera	1	0,6
Pus drenaje-empiema	3	1,9
Genitourinarias	4	2,6
Orina	1	0,6
Orina de sondaje	2	1,3
Orina de micción espontanea	1	0,6
Gastrointestinales	3	1,9
Heces	3	1,9
SNC	2	1,3
LCR por punción lumbar	2	1,3
Líquidos estériles	2	1,3
Líquido ascítico	1	0,6
Sangre por venopunción	1	0,6
TOTAL	154	100

Por lo que respecta a las muestras extrapulmonares (Figura 59 y Tabla 25), el 13,0% fueron abscesos/biopsias, seguidas a distancia de las muestras genitourinarias con un 2,6%. Cabe destacar la presencia de dos muestras de líquido cefalorraquídeo (1,3%) y una muestra de sangre (0,6%).

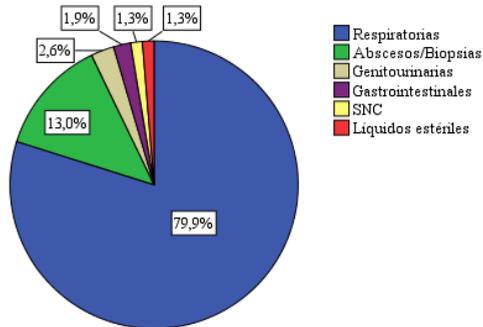


Figura 59. Tipos de muestras clínicas agrupadas.

4.2.4 Datos clínicos

4.2.4.1 Diagnóstico clínico

En la Figura 60 se observa que más de tres cuartas partes de los pacientes, cuyas cepas estudiamos, se diagnosticaron de tuberculosis pulmonar (se incluyen también dos casos de tuberculosis pleural, Tabla 26). El resto de los pacientes se diagnosticaron de tuberculosis extrapulmonar en un 14,3% y miliar en un 7,8%.

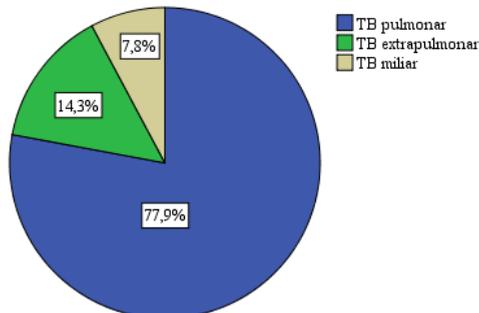


Figura 60. Diagnósticos clínicos agrupados de los pacientes origen de las cepas estudiadas.

Dentro de los 12 casos diagnosticados de tuberculosis miliar, dos casos presentaron TB pulmonar-ganglionar (1,3%), dos más TB pulmonar-meníngea (1,3%), un caso TB pulmonar-gastrointestinal (0,6%) y otro TB pulmonar-ostearticular (0,6%).

Resultados y Discusión

En cuanto a la TB extrapulmonar, destaca la TB ganglionar con 14 casos (9,1%), sin contar los dos casos de TB pulmonar-ganglionar incluidos en la TB miliar. Véase la Tabla 26.

Tabla 26. Diagnósticos clínicos de los pacientes origen de las cepas estudiadas.

Diagnóstico	n	%
TB pulmonar	118	76,6
TB ganglionar	14	9,1
TB miliar	12	7,8
TB genitourinaria	3	1,9
TB abdominal	2	1,3
TB pleural	2	1,3
BCGitis diseminada	1	0,6
TB meníngea	1	0,6
TB osteoarticular	1	0,6
Total	154	100

Señalar la presencia de dos pacientes con TB meníngea, uno de ellos también con TB pulmonar y del cual se estudió tanto la cepa pulmonar como meníngea. Por esta razón aparece como dos casos de TB pulmonar-meníngea (incluidos en TB miliar), pero que pertenecen al mismo paciente.

Dentro de los casos clasificados como autóctonos, en españoles se diagnosticaron 83 casos de TB pulmonar (83,0%), 11 casos de TB extrapulmonar (11,0%) y 6 casos de TB miliar (6,0%). Mientras que, en extranjeros fueron 31 casos de TB pulmonar (68,9%), 9 casos de TB extrapulmonar (20,0%) y 5 casos de TB miliar (11,1%). El grado de dependencia entre estas dos variables fue bajo (V de Cramer = 0,188) y no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 3,677$).

Por lo que respecta a los casos importados, se diagnosticó un caso de cada: una TB pulmonar, una TB extrapulmonar y una TB miliar. El escaso número de casos importados no permitió estudiar la asociación y la existencia de diferencias respecto a los casos autóctonos.

Otros aspectos estudiados fueron la edad y el género en función del diagnóstico. Por un lado, la distribución de la edad en función del diagnóstico se representa en la Figura 61. Donde las medias de edad fueron de 44,0 (40,3 - 47,6; IC 95%), 45,0 (36,1 - 54,1; IC 95%) y 40,8 años (25,3 - 56,2; IC 95%) para la TB pulmonar, extrapulmonar y miliar, respectivamente. La intensidad de la asociación entre ambas variables fue alta (tamaño del efecto 0,914), pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,963$).

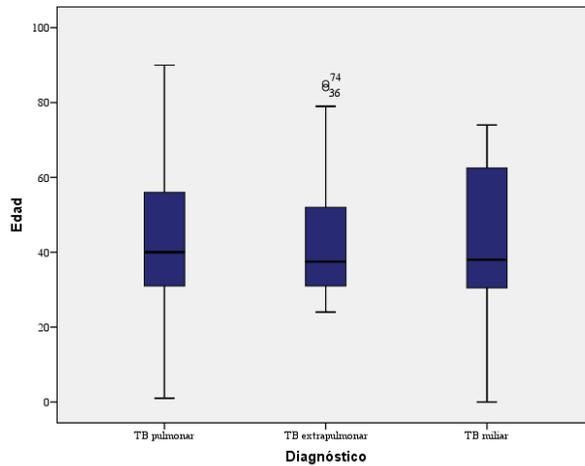


Figura 61. Distribución de edades en función del diagnóstico clínico.

Por otro lado, la distribución por género en función del diagnóstico clínico se muestra en la Figura 62. En los casos de TB pulmonar dos terceras partes fueron hombres; en la TB extrapulmonar los hombres representaron poco más de la mitad de los casos y en la TB miliar las mujeres no llegaron al 10% de los casos. El grado de dependencia entre estas dos variables fue bajo (V de Cramer = 0,178) y no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,089$).

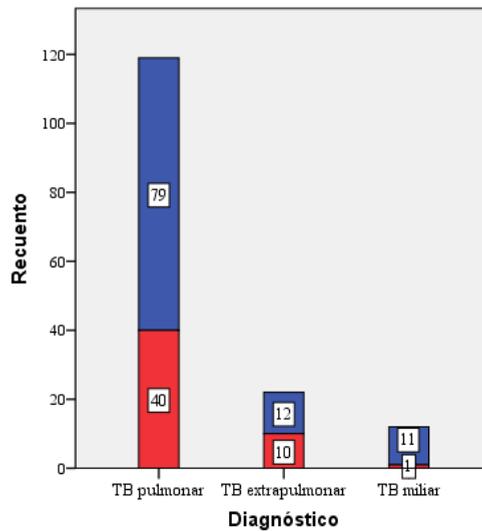


Figura 62. Distribución por género en función del diagnóstico clínico. Los valores que aparecen en el gráfico son frecuencias absolutas.

4.2.4.2 Casos bacilíferos

De los pacientes diagnosticados de TB pulmonar o miliar (todos los casos presentaron foco pulmonar), tres quintas partes presentaron baciloscopias positivas (Figura 63).

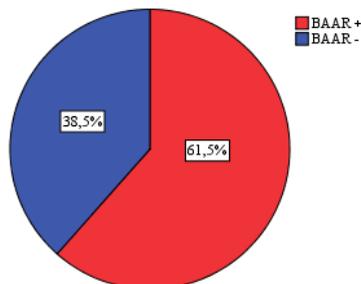


Figura 63. Pacientes con tuberculosis pulmonar o miliar con baciloscopia positiva.

En los casos importados la proporción de baciloscopias positivas fue similar a la obtenida a nivel global, con un 66,7%. No obstante, hay que tener en cuenta el bajo número de casos importados. En los casos autóctonos la proporción de baciloscopias positivas fue prácticamente idéntica a los datos globales (62,1%), debido también al bajo número de casos importados.

Dentro de los casos autóctonos, se representó el porcentaje de pacientes con baciloscopia positiva en función del origen, mostrado en la Figura 64. El 62,1% de las muestras respiratorias de pacientes españoles presentaron BAAR positivo ($n = 54$), suponiendo el 70,1% del total de BAAR positivos (independientemente del origen). Mientras que, en pacientes de otro origen el porcentaje de muestras respiratorias con BAAR positivo fue del 63,9% ($n = 23$; 29,9% del total de BAAR positivos). El grado de dependencia entre estas dos variables fue muy bajo (V de Cramer = 0,012) y no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,849$).

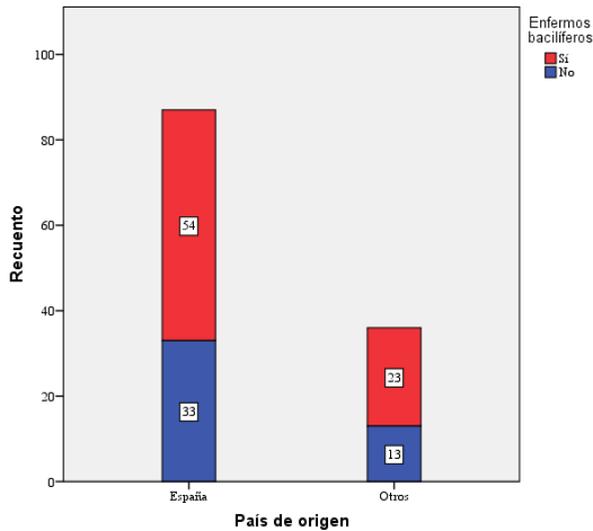


Figura 64. Distribución de los enfermos bacilíferos en función de si los casos autóctonos proceden de España u otro país. Los valores que aparecen en el gráfico son frecuencias absolutas.

La edad media de los pacientes con baciloscopia positiva (diagnosticados de TB pulmonar o miliar e independientemente del tipo de caso) fue de 41,6 años (37,4 – 45,8; IC 95%), ligeramente inferior a la de los pacientes con baciloscopia negativa, que es de 46,6 años (40,1 – 53,2; IC 95%). La intensidad de la asociación entre ambas variables fue alta (tamaño del efecto 1,989), pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,119$). Figura 65.

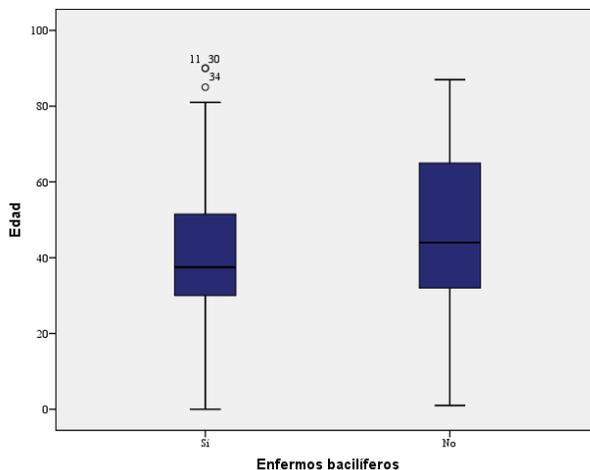


Figura 65. Distribución de edades entre enfermos bacilíferos y no bacilíferos.

Resultados y Discusión

Dentro de los pacientes con baciloscopia positiva el 70,0% fueron hombres y el porcentaje es similar, 65,3%, con baciloscopias negativas (Figura 66). El grado de dependencia entre estas dos variables fue muy bajo (V de Cramer = 0,067) y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,578$).

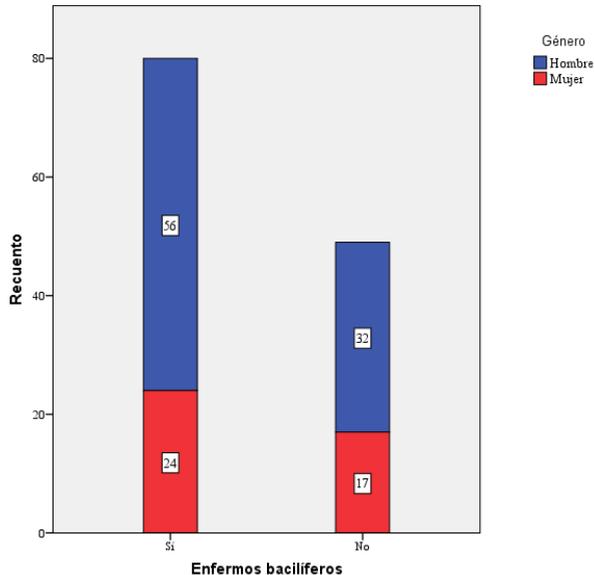


Figura 66. Distribución por género de los enfermos bacilíferos y no bacilíferos. Los valores que aparecen en el gráfico son frecuencias absolutas.

4.2.4.3 Coinfección por VIH

En la Figura 67 se observa que el 13,6% de los pacientes estaban infectados simultáneamente por el VIH, mientras que un 66,9% no. Es importante destacar el elevado número de casos ($n = 30$) donde la detección serológica del VIH no figuraba en la historia clínica, lo que representó el 19,5% restante.

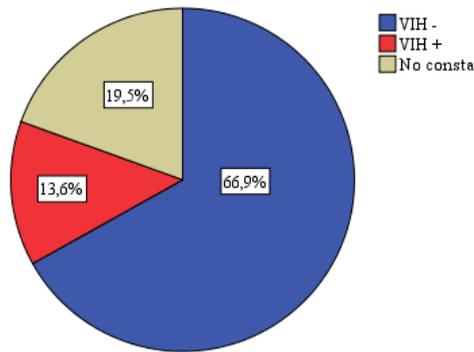


Figura 67. Distribución de la coinfección por el VIH entre los pacientes origen de las cepas estudiadas.

Los porcentajes de hombres y mujeres entre los pacientes infectados o no por el VIH es similar en ambos grupos, siendo dos terceras partes hombres (Figura 68). Esta distribución de género es la misma que la estudiada a nivel general. Tanto en hombres como en mujeres, la proporción del VIH está en torno al 16%, porcentaje similar al global sin contar los pacientes en los que esta información no constaba. El grado de dependencia entre estas dos variables fue muy bajo (V de Cramer = 0,026) y no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,769$).

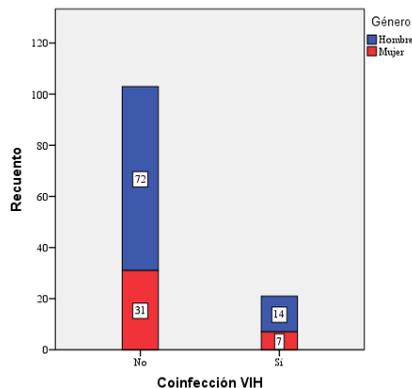


Figura 68. Distribución de los pacientes coinfectados por VIH en función del género. Los valores que aparecen en el gráfico son frecuencias absolutas.

La edad media de los pacientes VIH positivos fue de 39,1 años (34,7 – 43,5; IC 95%), ligeramente inferior a la de los pacientes VIH negativos, que fue de 41,9 años (37,8 – 45,9; IC 95%). La intensidad de la asociación entre ambas variables fue alta (tamaño del efecto 1,125), pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,934$). Figura 69.

Resultados y Discusión

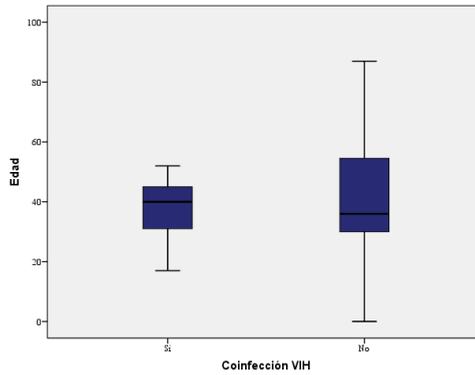


Figura 69. Distribución por edades en función de la coinfección VIH.

En cuanto a la coinfección por el VIH y al país de origen de los pacientes (Figura 70), tampoco se aprecian diferencias respecto al global, situándose el porcentaje de positivos alrededor del 16%. El grado de dependencia entre estas dos variables fue muy bajo (V de Cramer = 0,024), no hallándose diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,793$).

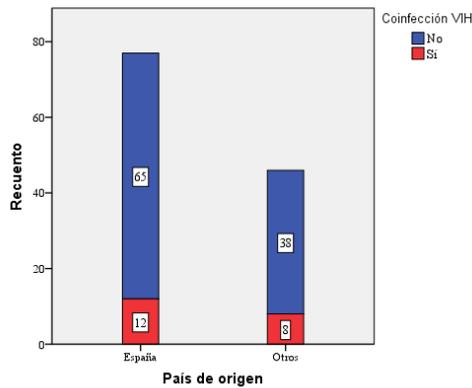


Figura 70. Distribución de los pacientes en función de la coinfección por el VIH y su país de origen.

Los valores que aparecen en el gráfico son frecuencias absolutas.

La distribución de la coinfección por el VIH en función del diagnóstico de TB se muestra en Figura 71. En los pacientes con TB pulmonar el porcentaje con VIH fue del 11,2%, en la TB miliar del 33,3% y en la TB extrapulmonar del 42,9%. El grado de dependencia entre estas dos variables fue bajo (V de Cramer = 0,301), encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,004$).

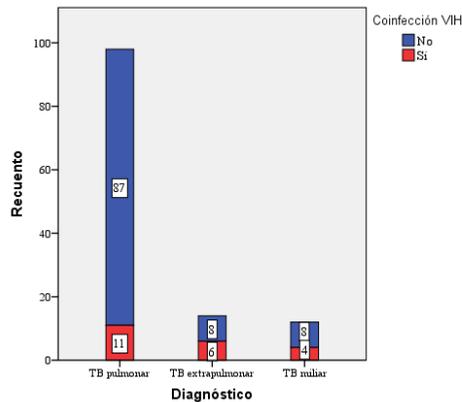


Figura 71. Coinfección por el VIH y diagnóstico de TB.
Los valores que aparecen en el gráfico son frecuencias absolutas.

4.2.4.4 Presencia de sintomatología

El 77,3% de los pacientes cuyas cepas estudiamos, presentaron algún tipo de sintomatología en el momento de la toma de la muestra ($n = 119$). De los 154 pacientes, 107 presentaron sintomatología respiratoria (69,5%) y 98 tuvieron síntomas generales⁹ inespecíficos (63,6%). En 31 casos no se pudo averiguar esta información (20,1%) y en cuatro casos (2,6%) no existía ningún tipo de síntoma. De estos cuatro casos, dos pertenecen al mismo paciente: un padre sin sintomatología, cuyo hijo ingresó por TB miliar, razón por la cual se le realizó el estudio.

Dentro de los pacientes con sintomatología respiratoria el 81,3% presentaban además síntomas generales (el 56,5% del total), mientras que el 18,7% restante no (el 13,0% del total). Desde el punto de vista de los pacientes con síntomas generales, solo el 11,2% no padecía sintomatología respiratoria, lo que representa el 7,1% del total. Dicho valor no se corresponde con el porcentaje de casos con TB extrapulmonar, sino que es la mitad de éste. Probablemente debido a que en un 20,1% de los casos no figuraba en la historia clínica información acerca de la sintomatología. Hubo un caso con sintomatología genitourinaria, pero sin síntomas respiratorios ni generales que, sumado a los 4 casos sin sintomatología de ningún tipo, suponen el 3,2% del total.

⁹Astenia, anorexia, pérdida de peso, diaforesis nocturna, febrícula o fiebre.

Resultados y Discusión

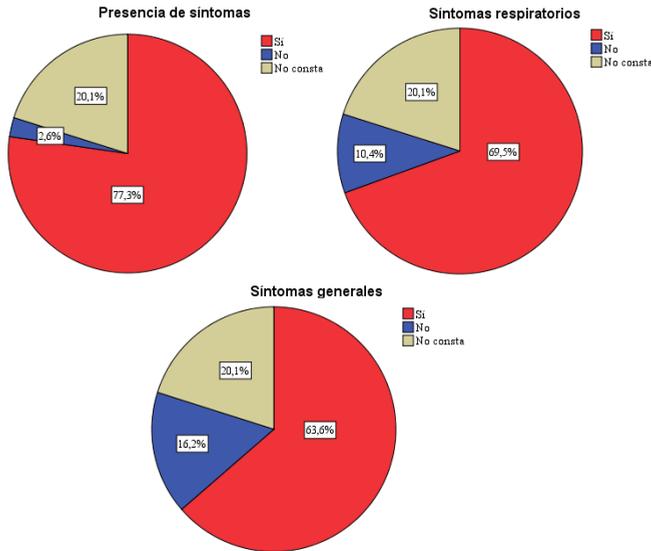


Figura 72. Distribución de los pacientes en función de la sintomatología.

4.2.4.5 Situación evolutiva de los pacientes

De los 154 casos estudiados, en 126 se pudo establecer la situación evolutiva del paciente (Figura 73). Se clasificaron como nuevos 111 casos (72,1%), en 14 casos hubo tratamiento previo (9,1%) y un caso fue clasificado por parte del facultativo responsable del paciente como probable contaminación intra-laboratorio (0,6%). Más adelante se estudiará este caso desde el punto de vista de la epidemiología molecular (MIRU - CC17 - apartado 4.7.2.2 y WGS - CC7 - apartado 4.9.1.1).

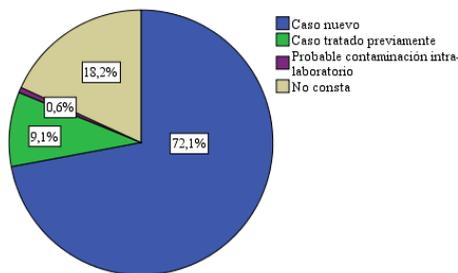


Figura 73. Situación evolutiva de los pacientes en el momento del diagnóstico microbiológico.

Entre los casos nuevos, el 80,2% fueron TB pulmonares, el 10,8% extrapulmonares y el 9,0% son diseminadas. En cuanto a los casos con tratamiento previo, el 85,7% fueron TB pulmonares y el 14,3% restante estuvo repartido por igual entre TB extrapulmonar y miliar, con un caso cada una. Figura 74.

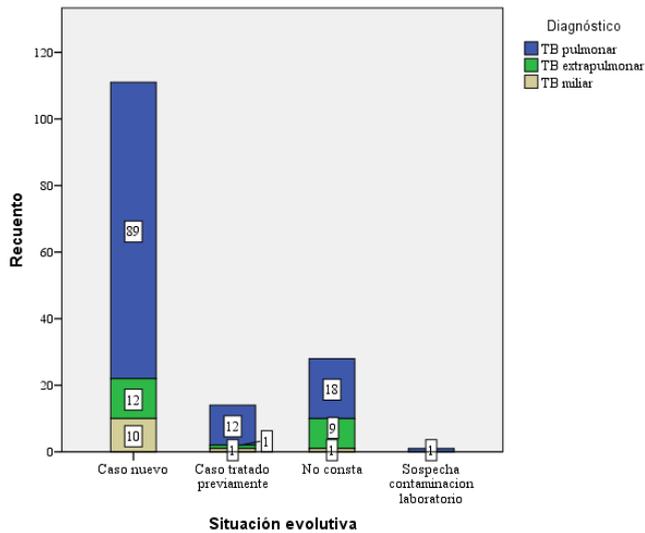


Figura 74. Situación evolutiva de los pacientes en función del diagnóstico. Los valores que aparecen en el gráfico son frecuencias absolutas.

Por lo que respecta al tipo de caso, dos de los tres casos importados fueron nuevos, mientras que el caso restante no se pudo clasificar por falta de información.

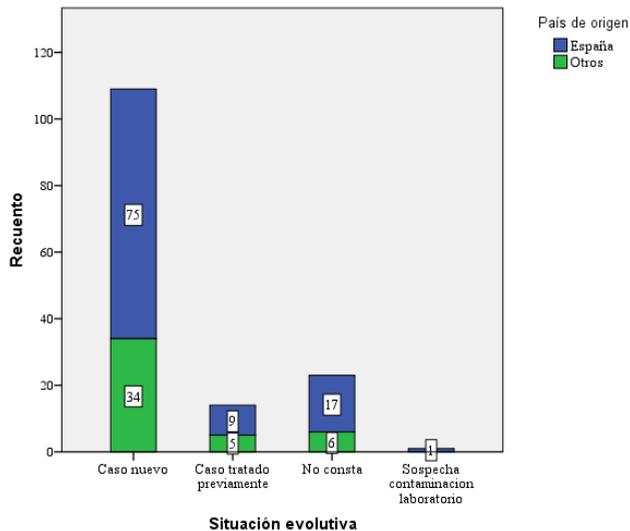


Figura 75. Situación evolutiva en función del origen de los casos autóctonos. Los valores que aparecen en el gráfico son frecuencias absolutas.

Dentro de los casos autóctonos (Figura 75), el 31,8% de los casos nuevos fueron pacientes extranjeros. Este porcentaje fue ligeramente superior en el

Resultados y Discusión

caso de los pacientes previamente tratados, que fue del 35,7%. No obstante, el número de casos con tratamiento previo fue claramente inferior al de casos nuevos.

4.2.4.6 Antecedentes y comorbilidades

En la Figura 76 se muestra la distribución de los pacientes en función de distintas comorbilidades (diabetes y neoplasias) o antecedentes de conductas adictivas (enolismo o UDVP). Cabe destacar que en las cuatro variables el porcentaje de datos que no figuraban en la historia clínica fue bastante elevado, entre el 16 y el 20%. La prevalencia de diabetes entre los pacientes estudiados fue del 11,0%, la de neoplasia del 9,7%, la de enolismo del 15,6% y la de UDVP del 5,2%.

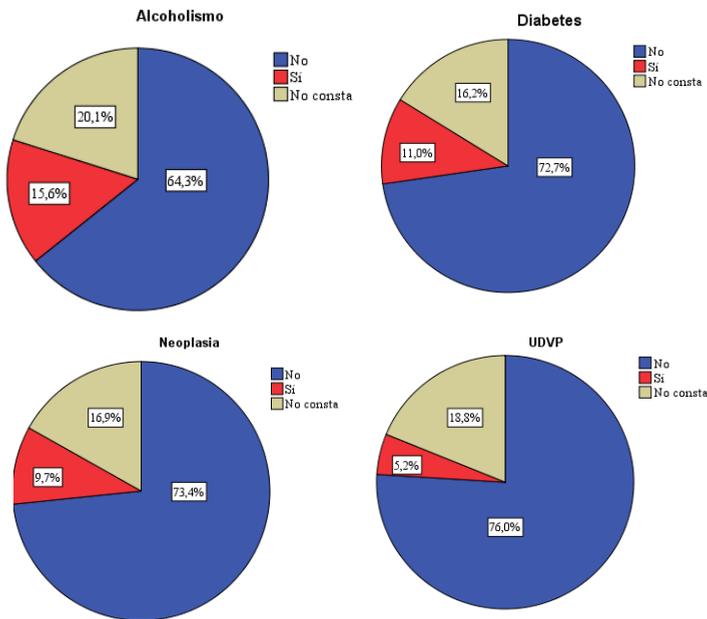


Figura 76. Distribución de los pacientes en función de los siguientes antecedentes o comorbilidades: enolismo, diabetes, neoplasias y UDVP.

4.2.4.7 Ingreso hospitalario

De los 154 casos estudiados, 97 de ellos fueron ingresados (63,0%) y 33 no (21,4%). En 24 casos no se pudo obtener este dato (15,6%).

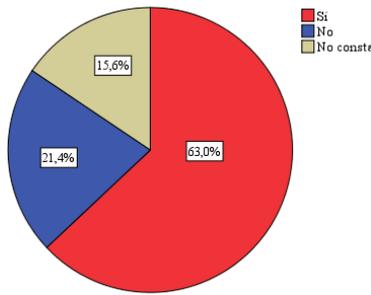


Figura 77. Datos sobre el ingreso hospitalario de los casos estudiados.

Por lo que respecta al porcentaje de ingreso hospitalario en función del diagnóstico de TB (Figura 78), en la pulmonar el 61,7% de los casos ingresaron, en la extrapulmonar fue del 50% y en la miliar del 100%. No obstante, el porcentaje de casos sin la información del ingreso en el grupo de TB extrapulmonar fue muy alta, situándose en el 36,4%. El grado de dependencia entre estas dos variables fue bajo (V de Cramer = 0,224), no pudiéndose constatar si la relación fue estadísticamente significativa o no debido al bajo número de casos en una de las casillas (TB miliar no ingresados) de la tabla de contingencia.

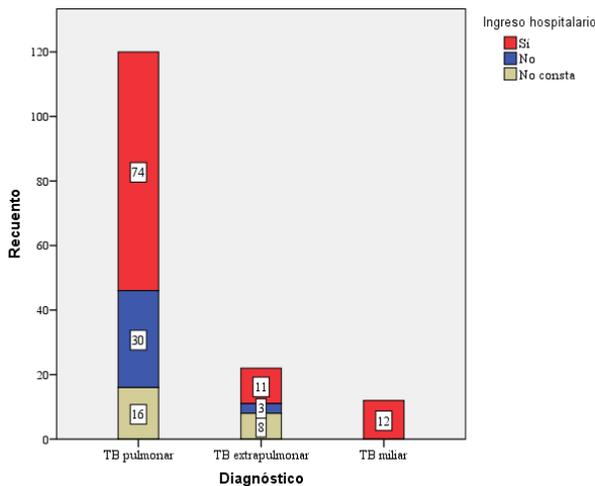


Figura 78. Ingreso hospitalario en función del diagnóstico. Los valores que aparecen en el gráfico son frecuencias absolutas.

El tiempo medio de estancia hospitalaria fue de 12 días (mediana 9 días). Con la estratificación de este dato por diagnóstico (Figura 79), se observa como en la TB pulmonar la estancia media fue de 10 días (mediana de 8), en la extrapulmonar de 13 días (mediana de 13) y en la miliar de 24 días (mediana de 25). La intensidad de la asociación entre ambas variables fue alta (tamaño

Resultados y Discusión

del efecto 3,775), hallándose diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,005$).

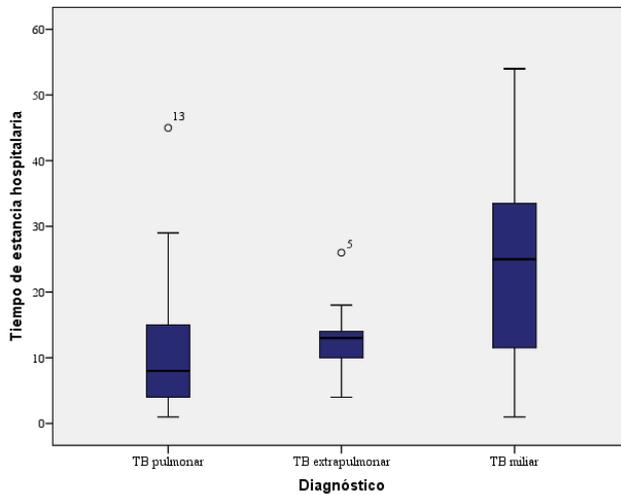


Figura 79. Tiempo de estancia hospitalaria en función del diagnóstico.

Otro aspecto estudiado que puede influir en el incremento de la estancia hospitalaria fue la coinfección por el VIH (Figura 80). En pacientes VIH negativos la estancia media estuvo en 11 días (mediana de 8), mientras que en coinfectados se incrementó hasta los 17 días (mediana de 15). La intensidad de la asociación entre ambas variables fue alta (tamaño del efecto 2,250), encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,001$).

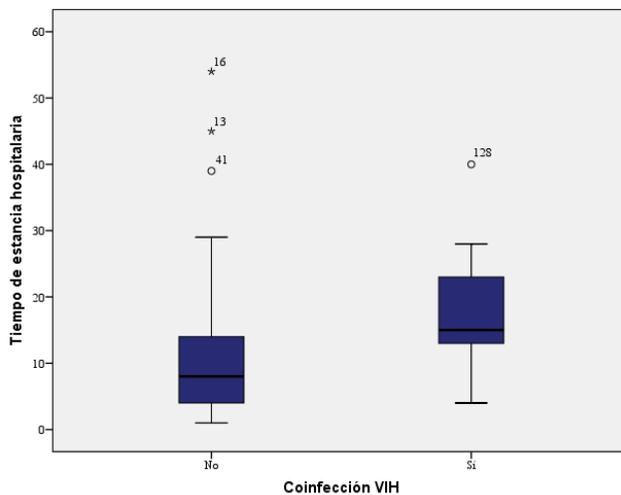


Figura 80. Tiempo de estancia hospitalaria en función de la coinfección por VIH.

4.2.4.8 Evolución de los pacientes tras el diagnóstico

Respecto a la evolución del tratamiento, solo se dispone de información de 102 de los 154 casos estudiados, lo que se muestra en la Tabla 27. Setenta y nueve casos completaron el tratamiento (51,3%), de los cuales solo se tiene confirmación de curación en 27 de ellos. Estos representan el 34,2% respecto a los que recibieron el tratamiento completo y el 17,5% del total. El porcentaje de pacientes ingresados en los casos resueltos fue del 63,0% y en aquéllos con tratamiento completo se situó en el 67,3%. Figura 81.

Tabla 27. Evolución de los casos estudiados.

Evolución de los casos	n	%
No consta	52	33,8
Tratamiento completo	52	33,8
Curación	27	17,5
Muerte	9	5,8
Traslado	5	3,2
Abandono	5	3,2
Fracaso terapéutico	2	1,3
Otro, no evaluado	1	0,6
Probable contaminación intra-laboratorio	1	0,6
TOTAL	154	100

Cabe destacar los nueve casos con desenlace fatal (5,8%): tres debido a la tuberculosis, tres debido a otras causas y en otros tres casos no se pudo establecer dicha relación de causalidad. En cuanto al diagnóstico, cuatro presentaban TB pulmonar, tres miliar, uno abdominal y otro meníngea. Todos ellos presentaron ingreso hospitalario. En cuanto a antecedentes y otras comorbilidades, dos casos presentaban antecedentes de alcoholismo, dos más presentaban procesos neoplásicos, cuatro casos de SIDA, un caso de diabetes y otro de EPOC.

Cinco casos (3,2%) se trasladaron fuera de la Comunidad Valenciana con las recomendaciones pertinentes para continuar el tratamiento. El 60% de ellos estuvieron ingresados.

Los casos que abandonaron el tratamiento representaron el 3,2%. De los cinco casos, tres de ellos eran casos tratados previamente y los otros dos eran casos nuevos. Todos ellos estuvieron ingresados, pero posteriormente se perdieron.

El porcentaje de fracasos terapéuticos fue del 1,3%. No presentaron comorbilidades ni antecedentes de interés. Solo uno de los casos estuvo ingresado.

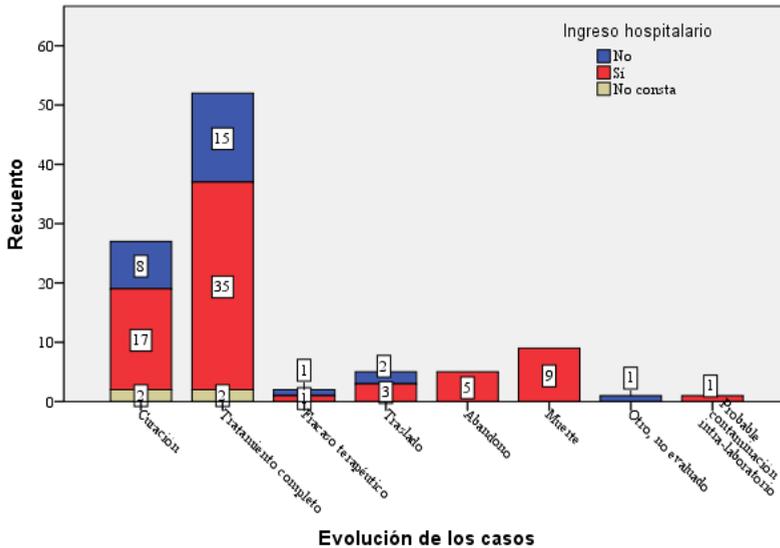


Figura 81. Evolución de los casos en función del ingreso hospitalario. Los valores que aparecen en el gráfico son frecuencias absolutas.

4.2.5 Datos temporales relacionados con la TB: asistencia sanitaria, diagnóstico y tratamiento

Los tiempos estudiados en el proceso que abarca desde el inicio de la sintomatología de los pacientes hasta el inicio del tratamiento, se muestra de forma esquemática en la Figura 36 - Apartado 3.2.5.

Para los casos nuevos, la media de tiempo desde la fecha de inicio de los síntomas hasta la fecha de solicitud de la petición de estudio de micobacterias fue de 82 días (mediana 61). Se correspondió con el tiempo hasta la asistencia sanitaria por parte de los pacientes y la sospecha de tuberculosis por el personal médico (situación a, Figura 36 del apartado 3.2.5).

El tiempo medio para el diagnóstico microbiológico de TB (situación b, Figura 36 del apartado 3.2.5) fue de 9 días (mediana 1 día). El valor de la media coincide con el cultivo de MTBC, mientras que la mediana correspondería con el diagnóstico rápido mediante baciloscopia y PCR.

En cuanto al tratamiento, el tiempo medio desde el diagnóstico microbiológico hasta el inicio del tratamiento antituberculoso (situación c, Figura 36 del apartado 3.2.5) fue de 1,7 días (mediana 0 días). El valor de la media sería consecuencia del diagnóstico rápido de TB, mencionado anteriormente, tras el cual se instaura el tratamiento. Por otro lado, el valor de la mediana se relaciona bien con el diagnóstico rápido o bien con el inicio del tratamiento en el momento de la sospecha clínica y radiológica, sin esperar al diagnóstico microbiológico.

4.3 Identificación fenotípica de los aislados

Los aislados incluidos en el estudio se caracterizaban por crecer adecuadamente a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ en atmósfera convencional, en el medio de cultivo de Löwenstein- Jensen. Las cepas pertenecientes a la especie *M. tuberculosis* presentaron colonias de color beige, esféricas, secas, rugosas, opacas, polimorfas y de dimensiones variables (Figura 82), lo que permitió saber que se trataba de cepas puras y viables. Estas características fenotípicas fueron las desarrolladas y observadas también en la cepa de control, *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177.



Figura 82. Colonias de *M. tuberculosis* crecidas en medio de Löwenstein-Jensen.

La cepa identificada como *M. bovis* BCG presentó un crecimiento disgónico, con colonias de tamaño más pequeño, aspecto liso y menos seco.

Además, se realizó una tinción de Ziehl-Neelsen para comprobar que se tratase de bacterias ácido-alcohol resistentes, descartando también posibles contaminaciones (Figura 83).

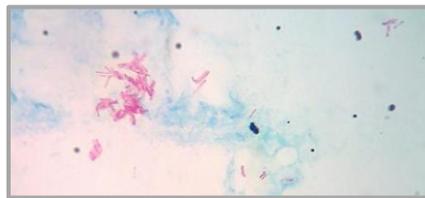


Figura 83. Tinción de Ziehl-Neelsen positiva realizada desde colonia.

4.4 Identificación del MTBC mediante inmunocromatografía

Mediante la prueba inmunocromatográfica BD MGIT Tbc (Figura 84) se identificaron como cepas pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* (MTBC) 153 de las 155 cepas estudiadas, lo que representa el 98,71% del total. Dos cepas, la CHGUV108 y la CHGUV143, no fueron identificadas por este dispositivo como pertenecientes a dicho complejo (1,29%). La primera de ellas era una cepa de *M. bovis* BCG y la segunda una cepa de *M. tuberculosis*, identificadas posteriormente mediante una técnica de hibridación inversa (GenoType MTBC, apartado 4.5). Tal y como se indica en las especificaciones de la propia casa comercial (194), algunas cepas secundarias de *M. bovis* BCG no producen el antígeno MPT64 (también denominado MPB64) y por tanto, puede ser una de las especies no identificables por esta técnica. Además, en

dichas especificaciones también se justifica que es posible la aparición de resultados falsamente negativos de la prueba inmunocromatográfica en cepas pertenecientes al MTBC, probablemente debido a mutaciones, deleciones o inserciones en el gen *mpb64* (76). Lo que pudo haber ocurrido con la cepa CHGUV143.

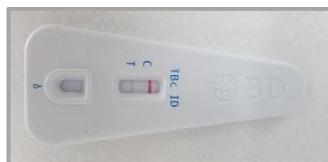


Figura 84. Técnica inmunocromatográfica BD MGIT TBc positiva.

4.5 Diferenciación de especies dentro del MTBC

La diferenciación de las especies dentro del MTBC se realizó sobre las 155 cepas, incluyendo la cepa control *M. tuberculosis* ATCC 25177 (H37Ra), mediante la técnica de hibridación inversa GenoType MTBC (véase el apartado de Metodología 3.9). Ciento cincuenta y cuatro cepas fueron identificadas como *M. tuberculosis*/*M. canettii* (99,35%) y la cepa restante fue identificada como *M. bovis* BCG (0,65%).

Todas las cepas hibridaron con las sondas número 1 (CC, control de conjugado), 2 (UC, control universal) y 3 (MTBC, específica de todas las especies comprendidas dentro del complejo *Mycobacterium tuberculosis*). La cepa control y los aislados clínicos identificados como *M. tuberculosis*/*M. canettii* hibridaron además con las sondas 4, 5, 6, 7 y 8. Mientras que, la cepa CHGUV108 hibridó con las sondas 4, 7, 9, 10 y 13, identificándola como *M. bovis* BCG. En el Apéndice II se recogen los resultados de todas las cepas estudiadas y en la Figura 85 se muestra alguno de los resultados obtenidos mediante el ensayo GenoType MTBC.

Las especies *M. tuberculosis* y *M. canettii* muestran el mismo patrón en el ensayo de hibridación inversa debido a que estas especies presentan idénticas secuencias genéticas *gyrB*. Por tanto, no es posible diferenciarlas con este ensayo. No obstante, es sabido que fenotípicamente, las colonias lisas, redondas y brillantes de *M. canettii*, difieren de todos los demás miembros del MTBC; excepto cuando las cepas de *M. canettii* se exponen a situaciones de estrés, pudiendo aparecer con un morfotipo rugoso, imitando a *M. tuberculosis* (7). Por tanto, para diferenciar de forma certera entre ambas especies existen otras técnicas, como el tipado de SNP mediante HRM o la WGS, las cuales se expondrán más adelante. Mediante un ensayo u otro se confirmó que todas las cepas clasificadas como *M. tuberculosis*/*M. canettii* por GenoType MTBC pertenecían a la especie *M. tuberculosis*.

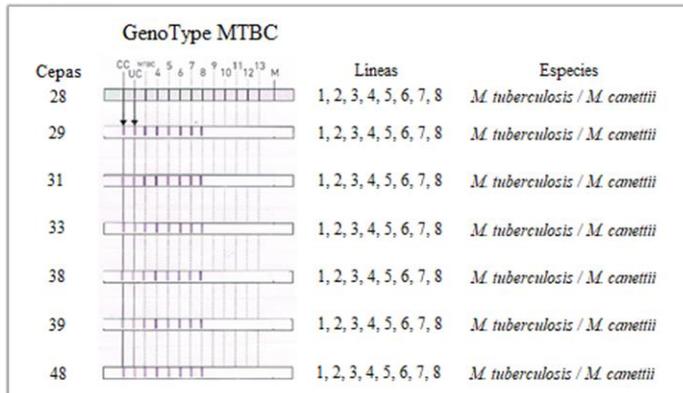


Figura 85. Ejemplo de resultados obtenidos mediante el ensayo GenoType MTBC.

Otro aspecto diferenciador es que *M. canettii* se ha aislado principalmente de pacientes africanos, con lo que la prevalencia en poblaciones no africanas es extremadamente baja (170).

4.6 Estudios de sensibilidad frente a fármacos antituberculosos

4.6.1 Estudios de sensibilidad fenotípica

El estudio de sensibilidad fenotípico se realizó en las 155 cepas estudiadas, empleando el sistema comercial automatizado en medio líquido Bactec™ MGIT™ 960, utilizando los kits *BD BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE* y *BD BACTEC™ MGIT™ 960 PZA* (véase el apartado de Metodología 3.10.1). Los resultados se pueden observar en el Apéndice III: Resultados de sensibilidad fenotípica de las 155 cepas.

Las cepas resistentes a isoniazida fueron diez (6,45%), de las cuales siete procedían de pacientes nuevos (70,00%, 4,52% respecto al total), dos de pacientes tratados previamente (20,00%, 1,29% respecto al total) y en un caso se desconocía este dato (0,65%, 10,00% respecto al total). Cinco cepas (3,23%) fueron resistentes a estreptomycin, distribuidos del siguiente modo: dos casos nuevos (40,00%, 1,29% respecto al total), uno tratado con anterioridad (20,00%, 0,65% respecto al total) y dos casos en los que no constaba ese dato (40,00%, 1,29% respecto al total). En cuanto a la pirazinamida, sólo se detectó una cepa resistente (0,65%), procedente de un caso nuevo. No se detectaron cepas resistentes a rifampicina ni a etambutol mediante esta técnica.

Según esta técnica, el 91,61% (n = 142) de las cepas fueron sensibles a todos los antituberculosos de primera línea, el 6,45% (n = 10) presentaron monorresistencia (7 a INH y 3 a SM) y solo el 1,94% (n = 3) polirresistencia; pero no se identificó ninguna cepa MDR mediante esta técnica. Entre las cepas polirresistentes, dos cepas (CHGUV082 y CHGUV084) presentaron resistencia a INH y SM, las cuales, como se verá más adelante, forman parte del mismo complejo clonal mediante genotipificación con MIRU-VNTR 24

loci. El paciente de una de ellas había recibido tratamiento previo, pero en la otra se desconocía este dato. La cepa restante con polirresistencia, cepa CHGUV108 identificada como *M. bovis* BCG, fue resistente a INH y PZA. En este caso, la resistencia a PZA era esperable, dado que *M. bovis* BCG es intrínsecamente resistente a dicho fármaco. En cuanto a la resistencia a INH, se han descrito cepas de *M. bovis* BCG con resistencia de bajo nivel a este fármaco, como la cepa BCG-Denmark (SSI 1331, *Statens Serum Institute*, Copenhague, Dinamarca) con una CMI entre 0,2 - 0,4 µg/ml y la cepa BCG-Connaught (Sanofi Pasteur, Toronto, Canadá) con una CMI entre 0,125 - 0,2 µg/ml (195-197). Por lo que respecta a la cepa de nuestro estudio (CHGUV108), se aisló en 2009 a partir de una muestra de sangre de un paciente procedente de otro hospital. No se pudo averiguar si la BCGitis diseminada de este paciente fue debida al empleo de alguna de estas cepas para la vacunación o para el tratamiento del carcinoma *in-situ* de vejiga, mediante instilaciones intravesicales.

4.6.2 Estudios de sensibilidad genotípica

4.6.2.1 *GenoType MTBDRplus*

Se realizó el estudio genotípico de resistencias mediante la técnica comercial *GenoType MTBDRplus* v.2.0. a 49 de las 155 cepas estudiadas (31,61%). La interpretación de los resultados se realizó siguiendo el manual de dicha técnica (171), tal y como se expone en el punto 3.10.2.1. A modo de ejemplo, en la Figura 86 se muestran los resultados de algunas de las cepas estudiadas mediante esta técnica. La explicación de esta figura se expone a continuación.

En los aislados CHGUV029, CHGUV108, CHGUV137 y CHGUV186 solo se observa el patrón de bandas de tipo salvaje. Por tanto, el cuadro de evaluación en las tres columnas de tipo salvaje es positiva “+” y negativa “-” en las tres columnas de mutación, lo que permite marcar las casillas “sensible a RMP” y “sensible a INH” con una cruz. Estas cepas son sensibles genotípicamente a INH y RMP según esta técnica.

A las cepas CHGUV082, CHGUV084, CHGUV132, CHGUV177 y CHGUV187 les falta la sonda de tipo salvaje *katG* y, además, presentan positiva la sonda “*katG* MUT1”. Esto es indicativo de la presencia de la mutación S315T, que confiere resistencia a INH de alto nivel. Por otro lado, no existe evidencia de resistencia a RMP.

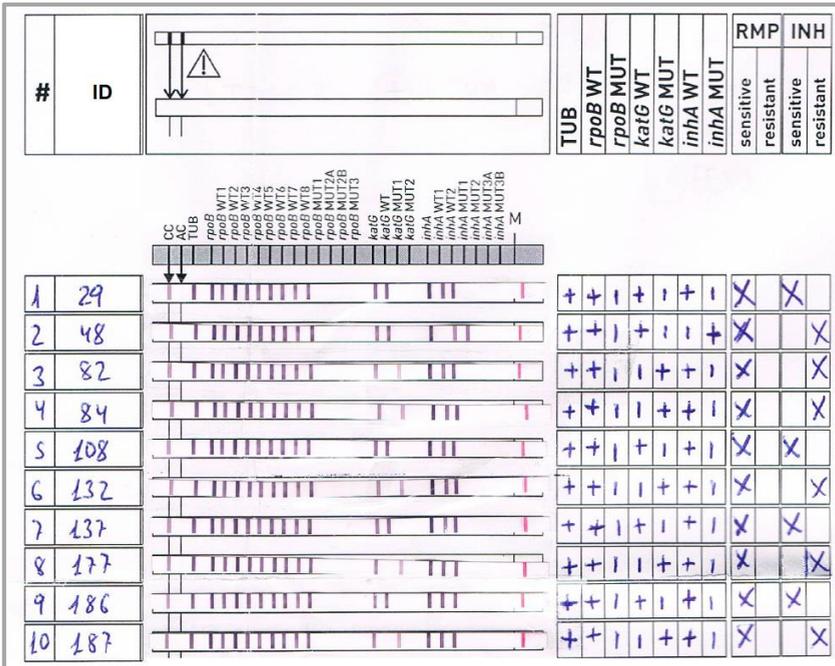


Figura 86. Resultados de 10 de las 49 cepas estudiadas mediante GenoType MTBDRplus v.2.0.

El prefijo del identificador de todas las cepas presentes en la figura es CHGUV. Las casillas con los símbolos “+”, “-” y “x” se leen en apaisado. La hoja de resultados del ensayo se ha abreviado para poder resaltar los aspectos importantes. Abreviaturas: CC - control del conjugado; AC - control de amplificación; TUB – complejo *M. tuberculosis*; *rpoB* WT1-8 - sondas de tipo salvaje en *rpoB*; *rpoB* MUT1-3 - sondas de mutaciones en *rpoB*; *katG* WT - sondas de tipo salvaje en *katG*; *katG* MUT1-2 - sondas de mutaciones en *katG*; *inhA* WT1-2 - sondas de tipo salvaje en *inhA*; *inhA* MUT1-3 - sondas de mutaciones en *inhA*; RMP – rifampicina; INH – isoniazida.

Finalmente, la cepa CHGUV048 carece de la banda *inhA* WT1 y presenta positiva la sonda de la *inhA* MUT1, lo que es indicativo de la mutación C-15T. Por consiguiente, se clasifica esta cepa como resistente de bajo nivel a INH y sensible a RMP.

Los resultados de la sensibilidad genotípica obtenidos mediante GenoType MTBDRplus v.2.0. de las 49 cepas estudiadas (véase Apéndice IV) son los siguientes: en 41 de ellas (83,67%) no se detectó resistencia ni a INH ni a RMP. Sí se detectó resistencia a INH en siete cepas (14,29%), bien debida a la mutación S315T del gen *katG* (10,20% respecto al total, 71,43% respecto a las resistentes a INH) o bien, a la mutación C-15T en la región promotora del gen *inhA* (4,08% respecto al total, 28,57% respecto a las resistentes a INH). La proporción de cepas resistentes a INH debidas a estos genes fue similar a la descrita en la literatura, 60-70% para *katG* y 8-20% para *inhA* (95,99,198). Destacar que la mutación en el codón 315 de *katG* fue la más frecuente y se

Resultados y Discusión

correlacionó con resistencia de alto nivel a INH (95,99,101,108,198,199). Por otro lado, las mutaciones en el promotor de *inhA* causan resistencia de bajo nivel a INH y resistencia cruzada con etionamida (95,99,101,198-200).

Las mutaciones detectadas se muestran en la Tabla 28. De los siete casos cinco se dieron en casos nuevos (71,43%, 10,20% respecto al total), uno fue tratado previamente (14,29%, 2,04% respecto al total) y en otro se desconocía este dato (14,29%, 2,04% respecto al total).

Tabla 28. Mutaciones asociadas a resistencia frente a INH y RMP obtenidas mediante GenoType MTBDRplus v.2.0. Abreviaturas: WT – cepa salvaje; MUT – mutación; RMP – rifampicina; INH – isoniazida; n – frecuencia absoluta.

Resistencia a RMP		Resistencia a INH				n
Gen <i>rpoB</i>		Gen <i>katG</i>		Gen <i>inhA</i>		
Pérdida WT1-8	Mutación	Pérdida WT	Mutación	Pérdida WT1-2	Mutación	
513-517 (WT3)	-	-	-	-	-	1
-	-	315	S315T1 (MUT1)	-	-	5
-	-	-	-	-15,-16 (WT1)	C-15T (MUT1)	2
TOTAL						8

Por lo que respecta a la resistencia a RMP, solo cabe destacar que en una cepa (2,04%) no se detectó la banda *rpoB* WT3 ni ninguna banda indicativa de mutación (Tabla 28). La secuenciación de esta cepa permitió explicar este hecho, siendo la causa una mutación silenciosa en el codón 514 del gen *rpoB* (TTC/TTT, F514F) con una frecuencia del 100%, que impidió la hibridación con la sonda *rpoB* WT3. Esta circunstancia se ha descrito previamente (201) y está recogida en el manual de usuario de la técnica (171), indicando que, en estos casos, se debe tener en cuenta los resultados de la prueba de sensibilidad fenotípica a RMP. De esta manera, ya que la cepa es sensible fenotípicamente a RMP y sabiendo mediante secuenciación que se trata de una mutación silenciosa, se consideraría un falso positivo de la técnica¹⁰.

Por consiguiente, el porcentaje de cepas sensibles a INH y RMP corregido sería del 85,71% (n = 42). El caso anterior se comparará en el siguiente apartado, con los datos de sensibilidad a fármacos obtenidos *in silico*, a partir de los datos de secuenciación de genoma completo.

¹⁰ El ensayo *Xpert*[®] *MTB/RIF assay* estaba realizado directamente de la muestra de esputo (por petición del clínico en el momento de extracción de la muestra) desde donde posteriormente se obtuvo la cepa ICHGUV548, obteniendo un resultado **positivo** para MTBC y para la resistencia a **RMP**. Este resultado falso positivo para la resistencia a RMP se ha solucionado en la nueva versión de *Xpert*[®] *MTB/RIF assay* denominada “Ultra” (81).

Una vez conocida la sensibilidad genotípica mediante GenoType MTBDR_{plus}, se compararon estos resultados con los datos fenotípicos (véase el Apéndice IV). Tomando como referencia los datos fenotípicos, la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de GenoType MTBDR_{plus} v.2.0. para isoniazida fueron del 70,00%, 100,00%, 100,00% y 92,83%, respectivamente. El dato de sensibilidad obtenido es inferior al del artículo de Coll *et al.* (101) que se sitúa en el 82,6%, mientras que el valor de especificidad en cambio sí concuerda. Las mutaciones causantes de la resistencia fenotípica de las tres cepas mal clasificadas probablemente no se detectaron debido a que no están incluidas en la técnica genotípica empleada. Dado que una de estas tres cepas fue secuenciada (cepa ICHGUV249), se pudo comprobar esta hipótesis en este caso al hallar *in silico* una mutación poco común en el gen *katG* (G273R), no incluida en la técnica GenoType MTBDR_{plus} v.2.0. En dicha cepa, también se detectó la mutación I491F en el gen *rpoB*, la cual confiere resistencia de bajo nivel a rifampicina; sin que se detectase mediante *BD BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE* ni con GenoType MTBDR_{plus} v.2.0. (mutación tampoco incluida). Este caso se comentará en el siguiente apartado.

Otra de las cepas cuya resistencia a INH no fue detectada mediante GenoType, fue la cepa de *M. bovis* BCG (CHGUV108). Como se ha mencionado anteriormente, la resistencia a INH de algunas cepas de BCG ya ha sido descrita previamente (195-197). En este caso, al no tener secuenciada la cepa, desconocemos la mutación concreta. No obstante, en la literatura se ha descrito una mutación en el gen *mma3* de todas las cepas de BCG obtenidas del Instituto Pasteur después de 1926 (202). La cual da como resultado una producción alterada del ácido metoximicólico. Dado que el objetivo de la actividad antituberculosa de la INH es la vía biosintética del ácido micólico, se ha especulado que esta mutación causaría una disminución de la sensibilidad a la INH para cepas de BCG obtenidas después de 1926. Estos datos respaldan esta hipótesis ya que cada cepa obtenida del Instituto Pasteur después de 1926 tiene una CMI moderadamente elevada para INH (197), como las cepas BCG-Denmark y BCG-Connaught.

Por lo que respecta a rifampicina, debido al bajo número de cepas resistentes, no se pudo calcular la sensibilidad ni el VPP. El VPN fue del 100,00% y la especificidad del 97,96%, similar al obtenido por Coll *et al.* (101). La disminución en la especificidad se debió al falso positivo de la cepa ICHGUV548, cuestión comentada anteriormente.

4.6.2.2 Secuenciación de genoma completo (WGS)

Se secuenciaron 55 cepas, obteniendo información sobre su sensibilidad a fármacos de primera línea (INH, RMP, EMB, SM y PZA) y algunos de segunda línea (FQ, AMK, KAN, CPR, ETH y resistencia cruzada entre INH y ETH). Como se ha mencionado previamente, el estudio de sensibilidad fenotípico frente a fármacos de primera línea se realizó estudiando la concentración crítica mediante la técnica comercial *BD BACTEC™ MGIT™*

Resultados y Discusión

960 SIRE y PZA. También se estudiaron 36 de estas cepas con la técnica GenoType MTBDR $plus$ v.2.0. Lo resultados se muestran en el Apéndice V: Resultados de la sensibilidad genotípica (WGS y GenoType) y fenotípica de 55 cepas.

Al comparar GenoType MTBDR $plus$ respecto a WGS, considerando la secuenciación como técnica de referencia para realizar esta comparación, se obtuvo una S, E, VPP y VPN del 50,00%, 100%, 100% y 97,14% para INH y del 0%, 96,97%, 0% y 91,43% para RMP, respectivamente. Cabe indicar que el número de muestras es bajo ($n = 36$) y que el número de cepas portadoras de mutaciones también lo es, con lo que los datos se deben interpretar con cautela.

La baja sensibilidad en la detección de la resistencia a INH se debe a la no detección de una de las dos mutaciones de resistencia. Concretamente la mutación G273R del gen *katG* (véase la Tabla 29), la cual es muy poco común y no está incluida en la técnica GenoType MTBDR $plus$ v.2.0. La mutación C-15T en la región promotora del gen *inhA* sí se detectó.

La especificidad y el VPP fueron muy buenos; mientras que el VPN disminuyó ligeramente al clasificar una cepa resistente como sensible.

Tabla 29. Mutaciones de resistencia encontradas *in silico* tras WGS y comparación respecto a GenoType MTBDR $plus$ v.2.0.

La posición de los codones hace referencia a la cepa H37Rv. Las casillas vacías sombreadas en gris claro son indicativas de que la técnica no detecta la resistencia frente a dichos fármacos. Abreviaturas: ID – identificación; Mut – mutación; Freq – Frecuencia alélica (%); ND – No detectada; Concord – Concordancia entre ambas técnicas.

ID Cepa	WGS				GenoType		Concord
	Resistencia	Gen	Mut	Freq	Gen	Mut	
ICHGUV249	INH	<i>katG</i>	G273R	42,11	ND	ND	No
	RMP	<i>rpoB</i>	I491F	99,41	ND	ND	No
ICHGUV862	ETB	<i>embB</i>	M306V	100,00			
ICHGUV863	INH	<i>inhA</i>	C-15T	100,00	<i>inhA</i>	C-15T	Sí
ICHGUV994	RMP	<i>rpoB</i>	S431T	70,97	ND	ND	No
		<i>rpoB</i>	H445N	53,52	ND	ND	No
	PZA	<i>rpsA/30S</i>	V262M	50,00			
	AMK, KAN, CPR	<i>rrs/16S</i>	-*	85,66			
		<i>rrs/16S</i>	**	86,16			
ICHGUV1590	RMP	<i>rpoB</i>	I491F	100,00	ND	ND	No

*Posición 1473247, cambio C/A.

** Posición 1473329, cambio G/T.

En cuanto a la RMP, hubo tres cepas resistentes, ninguna de las cuales fue detectada (Tabla 29). Este hecho, unido al bajo número de cepas estudiadas con resistencia fenotípica a RMP, explica la nula sensibilidad obtenida. De esas tres cepas resistentes a RMP, dos cepas presentaron la misma mutación, la I491F (codón referido a la cepa H37Rv (172) o I572F referido a *E. coli*), la cual se ubica fuera de la región determinante de resistencia a rifampicina (RRDR). Se trata de una región de 81 pb localizada en el centro del gen *rpoB*

(codones 428 a 456) que determina el 95% de la resistencia a la RMP (106,199,203). No obstante, se han descrito brotes de tuberculosis MDR donde los clones presentaron la mutación I491F ubicada fuera de la RRDR, como el descrito por Sánchez-Padilla *et al.* en Suazilandia (204), país denominado actualmente Reino de Eswatini. En dicho artículo se indica que el 30% de sus cepas MDR presentaban la mutación I491F (cepas obtenidas en 2009). Por otro lado, esta mutación no fue detectable mediante los sistemas comerciales actuales que únicamente estudian la región RRDR, como los ensayos GenoType MTBDR*plus* v.2.0. (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Alemania), Xpert® MTB/RIF assay¹¹ (Cepheid, EE.UU.) o su nueva versión “Ultra” (81,204), Abbott *RealTime* MTB RIF/INH *Resistance* (Abbott GmbH & Co. KG) y MDR/MTB ELITE MGB® (ELITech Group S.p.A.). Por consiguiente, es importante conocer la prevalencia en nuestro entorno de esta mutación u otras ubicadas fuera de la RRDR, ya que influirá en la sensibilidad de las técnicas comerciales habitualmente empleadas.

La otra cepa resistente a RMP no clasificada como tal por GenoType, presentaba dos mutaciones en el gen *rpoB*: S431T y H445N (o S512T y H526N referidos a *Escherichia coli*, respectivamente). La mutación S431T no presenta una sonda específica para ser detectada mediante GenoType, pero sí debía haber impedido la hibridación de la sonda *rpoB* WT2/WT3. No obstante, la existencia de esta mutación en una frecuencia alélica del 71%, pudo suponer que el 29% restante de la población (sin dicha mutación), positivizasen esas bandas (véase Figura 38, Tabla 9 y Tabla 29). Por otro lado, la mutación H445N (H526N) sí presenta dos bandas de mutación específicas para este codón, pero ninguna de ellas codifica para el aminoácido mutante, en nuestro caso asparagina, sino para tirosina (*rpoB* MUT2A) o ácido aspártico (*rpoB* MUT2B). Lo que concuerda con la no identificación de la mutación. Igual que en el caso anterior, la mutación debía haber impedido la hibridación de la sonda *rpoB* WT7, pero al no estar presente en toda la población micobacteriana (solo en un 54%) sí se produjo (véase Figura 38, Tabla 9 y Tabla 29).

La ligera disminución de la especificidad se debió a un resultado falso positivo debido a la no detección de la sonda *rpoB* WT3 (cepa ICHGUV548), como consecuencia de la mutación silenciosa F514F (ya explicado en el apartado 4.6.2.1). El VPP fue nulo debido al falso positivo y a la no detección de verdaderos positivos.

También se compararon los datos de sensibilidad frente a antituberculosos de primera línea obtenidos *in silico* tras WGS con los resultados fenotípicos (técnica de referencia) obtenidos mediante *BD BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE* y *PZA* (n = 55). Véase la Tabla 30.

¹¹ El ensayo Xpert® MTB/RIF assay estaba realizado directamente de la muestra de esputo (por petición del clínico en el momento de extracción de la muestra) desde donde posteriormente se obtuvo la cepa ICHGUV249, obteniendo un resultado positivo para MTBC y **negativo** para la resistencia a **RMP**.

Tabla 30. Comparación del estudio de sensibilidad genotípico mediante WGS respecto al fenotípico (técnica de referencia) para los antituberculosos de primera línea. Los valores de sensibilidad (S), especificidad (E), VPP y VPN son porcentajes.

	S	E	VPP	VPN
INH	100,00	100,00	100,00	100,00
RMP	NA	94,55	0,00	100,00
SM	0,00	100,00	NA	98,18
EMB	NA	98,18	0,00	100,00
PZA	NA	98,18	0,00	100,00

Los resultados se comentan seguidamente en función de cada fármaco.

Isoniazida

La correlación entre ambos métodos es excelente según estos datos. Sin embargo, el número de cepas resistentes es demasiado bajo para sacar conclusiones. Las mutaciones de resistencia encontradas se exponen a continuación.

- Mutación C-15T en la región promotora del gen *inhA-fabG1*. Supone la sobreexpresión de la proteína codificada por *inhA* (4, 2-trans-enoyl-ACP reductasa) involucrada en la síntesis de ácidos micólicos, oponiéndose al mecanismo de acción de la INH. Esto ocasiona resistencia de bajo nivel a INH (106,199) y resistencia cruzada a etionamida (95,99,101,198-200).
- Mutación G273R del gen *katG*. Es una mutación muy poco común que no consta todavía en ninguna base de datos y que está pendiente de ser publicada por el grupo del Dr. Iñaki Comas. Confiere resistencia de alto nivel a INH, comprobado por este grupo mediante microdilución en caldo, obteniendo una CMI >32 µg/ml.

Rifampicina

La sensibilidad de la técnica no se pudo calcular debido a que no se incluyeron cepas resistentes mediante el método fenotípico. La especificidad fue alta, pero disminuyó debido a la detección de tres cepas resistentes no detectadas fenotípicamente. Este mismo hecho explica el VPP obtenido. Por otro lado, el VPN fue muy bueno.

Las mutaciones encontradas en el gen *rpoB* fueron la S431T (S512T) y la H445N (H526N), dentro de la RRDR, y la I491F (I572F) fuera de ella. En el caso concreto de la mutación I491F, Comas *et al.* estudiaron la sensibilidad a RMP de la cepa ICHGUV249 (portadora de dicha mutación) mediante el método de las proporciones, siendo resistente a la concentración crítica de 1 µg/ml. Esta discrepancia está descrita en el artículo de Rigouts *et al.* (205), donde todas las cepas con la mutación I491F (n = 7) se identificaron sistemáticamente como sensibles a RMP por MGIT a la concentración crítica de 1 µg/ml. Mientras que, por el método de las proporciones a la misma concentración, seis de ellas fueron resistentes. En el artículo de Walker *et al.* (111) también se llegó a la misma conclusión.

Otra de las mutaciones encontradas es la H445N, que es una de las mutaciones referidas en la literatura como “*disputed*” (cuestionables) del gen *rpoB* (206). El artículo de Miotto *et al.* (206) explica que las pruebas de CMI sobre cepas con mutaciones denominadas “*undisputed*” (indiscutibles) se asocian con valores de CMI más altos ($\geq 20 \mu\text{g/ml}$) en comparación con las que presentan mutaciones “cuestionables” (de $4 < 20 \mu\text{g/ml}$). Y que las cepas con mutaciones “indiscutibles” no muestran ningún retraso en el tiempo de positividad del medio líquido en comparación con el control, al emplear el protocolo MGIT extendido. Mientras que, las mutaciones “cuestionables” sí presentan un retraso medio de 7,2 días, proporcionando la evidencia de que las mutaciones que confieren resistencia de bajo nivel a RMP están asociadas a un retraso en el crecimiento en MGIT.

En conclusión, la no detección mediante el ensayo *BD BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE* pudo deberse a que las mutaciones que confieren resistencia de bajo nivel a RMP repercuten en el crecimiento micobacteriano en medio líquido, siendo este más lento de lo normal y, por consiguiente, no fueron detectadas a tiempo mediante esta técnica con el protocolo estándar (205,206).

Estreptomicina

La nula sensibilidad a este fármaco se debió a la no detección de la única cepa resistente a estreptomicina incluida, además del escaso número de cepas resistentes estudiadas. La especificidad y el VPN fueron muy buenos; mientras que el VPP no se pudo calcular.

Etambutol

La sensibilidad de la técnica a EMB no se pudo calcular debido a que no se incluyeron cepas resistentes a este fármaco por el método fenotípico. La especificidad fue alta, pero disminuyó debido a la detección de una cepa resistente no detectada fenotípicamente. Este mismo hecho explica el VPP obtenido. Por otro lado, el VPN fue muy bueno.

La mutación detectada fue la sustitución de una metionina por una valina en el codón 306 (M306V) del gen *embB* (Tabla 29), pero no se detectó fenotípicamente.

El gen *embB* codifica la enzima arabinosil transferasa, que interviene en la síntesis de la pared celular, en concreto en la síntesis de arabinogalactano y en menor medida el lipoarabinomano (95). Las mutaciones en el codón 306 son las más frecuentes, seguidas del codón 406, ambas responsables del 60 - 80% de la resistencia fenotípica a este antimicobacteriano (95). En este estudio la mutación detectada fue la M306V, la cual se ha descrito previamente en la base de datos *Tuberculosis Drug Resistance Mutation* (162). La discrepancia observada respecto a la técnica fenotípica, también está descrita en dicha base de datos, así como en otros artículos (101,108,111), donde consideran que el

estudio fenotípico de EMB es un estándar imperfecto, particularmente para aislamientos con mutaciones en el gen *embB*.

Pirazinamida

La sensibilidad de la técnica a PZA no se pudo calcular debido a que no se incluyeron cepas resistentes a este fármaco mediante el método fenotípico. La especificidad fue alta, pero disminuyó debido a la detección de una cepa resistente no detectada fenotípicamente. Este mismo hecho explica el VPP obtenido. Por otro lado, el VPN fue muy bueno.

Mediante WGS se detectó una mutación en el codón 262 del gen *rpsA*/30S (V262M) en una proporción del 50% (Tabla 29). La resistencia a PZA está asociada en la mayoría de los casos a mutaciones en el gen *pncA* o en su región promotora. Este gen codifica la enzima pirazinamidasa que se encarga de la activación de la PZA (profármaco) en ácido pirazinoico (POA) en el interior de la micobacteria. También se han descrito otros mecanismos de resistencia frente a este antifímico, relacionados con mutaciones en los genes que codifican para las principales dianas conocidas del POA, como son la proteína ribosomal S1 (RpsA) de la subunidad 30S y la enzima aspartato descarboxilasa (PanD), genes *rpsA* y *panD*, respectivamente (101,102). PanD interviene en la síntesis del ATP (102), mientras que RpsA está involucrada en la traducción de proteínas y, sobre todo, en el proceso de trans-traducción (207). Este proceso permite liberar los ribosomas bloqueados durante la traducción en situaciones de estrés, marcando las proteínas truncadas para su degradación, ya que los polipéptidos incompletos pueden ser tóxicos para la célula (207). Es especialmente importante en organismos no replicantes donde los ribosomas son escasos, por lo que su inhibición puede explicar la capacidad de la PZA para erradicar organismos con un metabolismo enlentecido. Por lo que respecta a la mutación V262M encontrada en el gen *rpsA*, no es una de las habitualmente descritas (101,102,207,208) y no hubo correspondencia con el método fenotípico. Esta discrepancia podría deberse a varias razones. En primer lugar, podría ser que no tuviese un efecto sobre la resistencia a la PZA. Las mutaciones en el gen *rpsA* descritas hasta ahora que confieren resistencia a PZA están ubicadas en el dominio R4 (codones 294 - 361) y el extremo C-terminal de la proteína RpsA (codones 433 - 482) (101,102,207,208), mientras que el codón 262 pertenece al dominio R3 (Figura 87). Serían necesarios más estudios sobre esta mutación.

En segundo lugar, la mutación se detectó con una frecuencia alélica del 50%, con lo cual, en caso de que la proteína RpsA mutada (RpsA^{MT}) impidiese su unión con el POA, la proteína RpsA^{MT} competiría con el complejo POA - RpsA^{WT} por la unión con el ARN mensajero de transferencia (ARN_{mt}) encargado de la terminación de polipéptidos bloqueados. La unión RpsA^{MT} - ARN_{mt} permitiría la liberación del ribosoma, pero no la unión POA - RpsA^{WT} - ARN_{mt}. Si se considera irreversible la unión POA - RpsA^{WT} - ARN_{mt}, en una situación con un número de ribosomas limitados, se podría explicar esta discrepancia a pesar de la mutación.

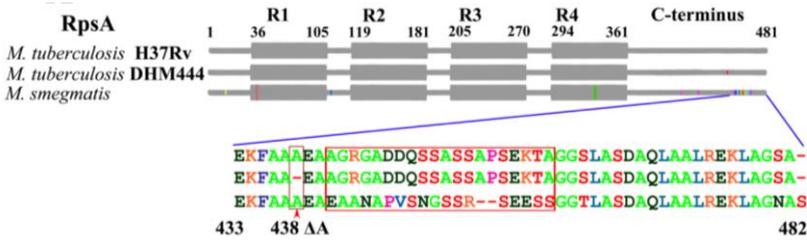


Figura 87. Alineación de los codones de la proteína RpsA de *M. tuberculosis* H37Rv, de la cepa DHM444 de *M. tuberculosis* resistente a PZA y *M. smegmatis*.

R1 a R4 representan los cuatro dominios homólogos de unión al ARN en RpsA. Fuente: Shi *et al.* (207).

Y en tercer lugar, a esta discrepancia también pueden contribuir las dificultades técnicas ya conocidas del estudio de sensibilidad fenotípico a PZA. Éstas se deben a que este fármaco es activo en medio ácido (pH 5,5) y por tanto, el pH del medio de cultivo se debe adecuar a estas condiciones, a pesar de que aproximadamente un 10% de los aislamientos de *M. tuberculosis* no crecen bien a ese pH (95). Pudiera ser que esta cepa se encontrase dentro de ese grupo.

4.7 MIRU-VNTR

4.7.1 Estandarización de la tipificación MIRU-VNTR de 24 loci

La estandarización de la técnica MIRU-VNTR de 24 *loci* se realizó empleando la cepa control H37Ra (ATCC 25177), de acuerdo con las especificaciones indicadas en el apartado 3.11.1 dentro del capítulo metodológico. Los resultados se muestran en la Figura 88 y la Figura 89.

Con los resultados de la electroforesis se calcularon los tamaños de los amplicones de cada *locus* en pares de bases (pb), comparándolos con un marcador de peso molecular conocido. Posteriormente, se interpolaron en una tabla alélica predefinida (véase Apéndice VI: Tabla alélica MIRU-VNTR 24 *loci* descrita por Supply *et al.* (175)), obteniendo como resultado un número, equivalente a la variante alélica o al número de repeticiones (VNTR) de un *locus* concreto. En la Tabla 31 se representa la asignación alélica de la cepa control H37Ra (ATCC 25177) de acuerdo con la Figura 88 y la Figura 89.

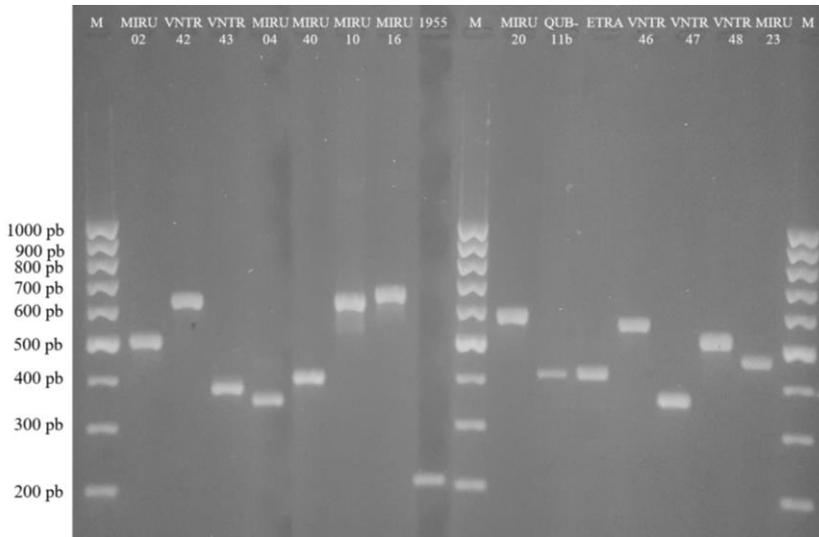


Figura 88. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de 15 de los 24 *loci* estudiados en la cepa control H37Ra (ATCC 25177).

Abreviaturas: M - Marcador de peso molecular; CN – Control Negativo.

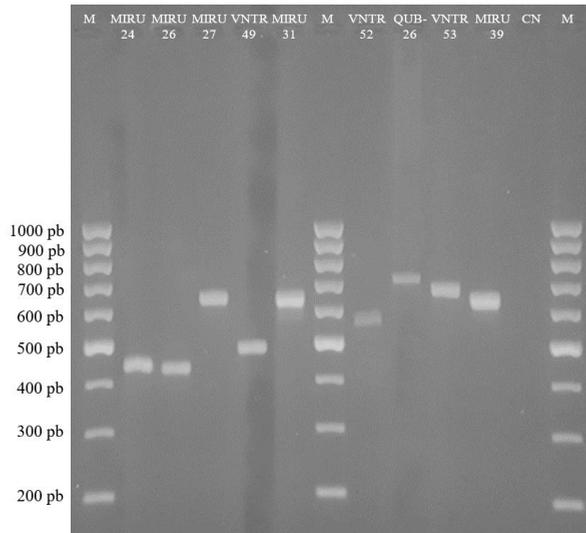


Figura 89. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los restantes 9 *loci* estudiados en la cepa control H37Ra (ATCC 25177).

Abreviaturas: M - Marcador de peso molecular; CN – Control Negativo.

Resultados y Discusión

Tabla 31. Asignación alélica de la cepa de control H37Ra (ATCC 25177). Se muestra la nomenclatura convencional de cada uno de los 24 *loci*, así como otras denominaciones (alias) también empleadas en la literatura. Abreviaturas: VA – variante alélica; pb – tamaño de los amplicones en pares de bases.

Convención MIRU-VNTR	Alias 1	Alias 2	H37Ra	
			pb	VA
154	MIRU 02		508	2
424	Mtub04	VNTR 42	639	2
577	ETRC	VNTR 43	382	4
580	MIRU 04		353	3'
802	MIRU 40		408	1
960	MIRU 10		643	3
1644	MIRU 16		671	2
1955	Mtub21	1955	206	2
2059	MIRU 20		591	2
2163	QUB2163b	QUB-11b	412	5
2165	ETRA		420	3
2347	Mtub29	VNTR 46	563	4
2401	Mtub30	VNTR 47	363	2
2461	ETRB	VNTR 48	518	3
2531	MIRU 23		465	6
2687	MIRU 24		447	1
2996	MIRU 26		438	3
3007	MIRU 27	QUB-5	657	3
3171	Mtub34	VNTR 49	488	3
3192	MIRU 31	ETRE	651	3
3690	Mtub39	VNTR 52	562	5
4052	QUB-26		708	5
4156	QUB4156	VNTR 53	681	2
4348	MIRU 39		646	2

4.7.2 Tipificación mediante MIRU-VNTR 24 *loci*

Tras estandarizar la técnica mediante la cepa H37Ra, se tipificaron las 154 cepas clínicas mediante la metodología descrita en el apartado 3.11.1. En cada una de las PCR realizadas se introdujo un control positivo (cepa H37Ra) y un control negativo. Además, se introdujeron dos controles internos, los cuales consistieron en dos repeticiones de la misma cepa con números de identificación diferentes (CC 19: CHGUV336 = ICHGUV256 y CC 16: ICHGUV1008 = ICHGUV1449). En ambos casos se obtuvo el mismo mirutipo (véase el Apéndice VIII: Cepas estudiadas mediante MIRU-VNTR 24 *loci*).

A continuación, se muestra a modo de ejemplo, las imágenes de las electroforesis de algunas de las cepas clínicas para cada uno de los 24 *loci* estudiados. Véase de la Figura 90 a la Figura 113.

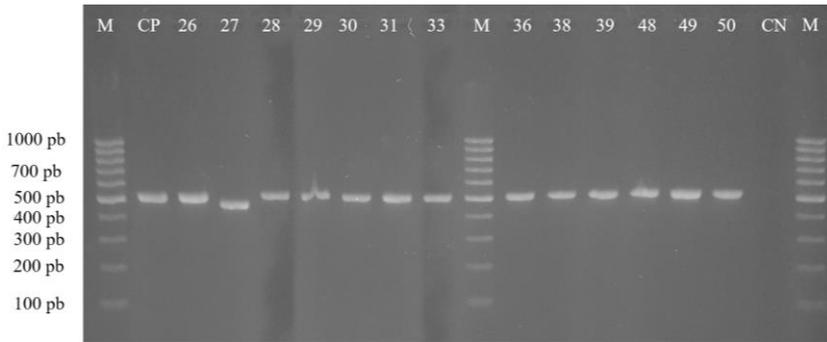


Figura 90. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del *locus* 154 (MIRU 02). Se estudiaron 13 cepas, el control positivo y el control negativo. El prefijo de todas las cepas que aparecen en la figura es CHGUV. Cepa 27: 455 pb (1 repetición). CP y cepa 26, 28, 29, 30, 31, 33, 36, 38, 39, 48, 49 y 50: 508 pb (2 repeticiones). Abreviaturas: M - Marcador de peso molecular; CP - Control Positivo (H37Ra); CN - Control Negativo.

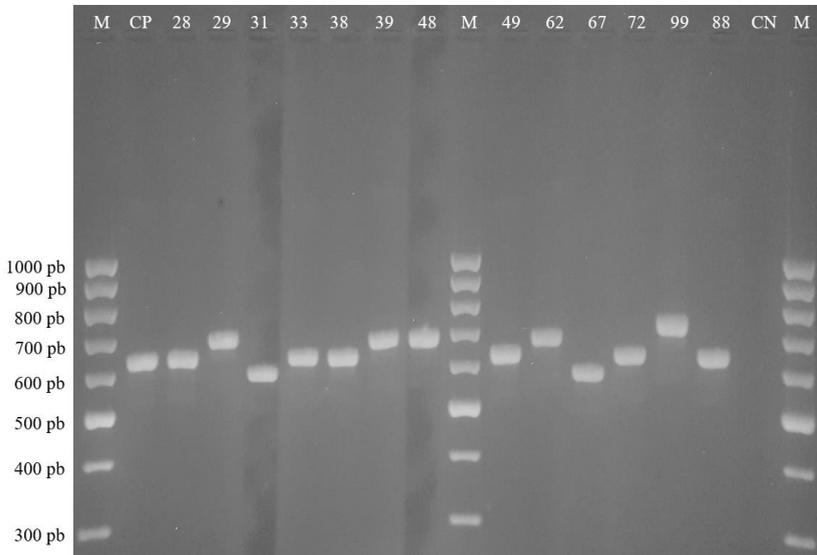


Figura 91. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del *locus* 424 (VNTR 42 o Mtub 04). Se estudiaron 13 cepas, el control positivo y el control negativo. El prefijo de todas las cepas que aparecen en la figura es CHGUV. Cepa 31 y 67: 588 pb (1 repetición). CP y cepas 28, 33, 38, 49, 72 y 88: 639 pb (2 repeticiones). Cepa 29, 39, 48 y 62: 690 pb (3 repeticiones). Cepa 99: 741 pb (4 repeticiones). Abreviaturas: M - Marcador de peso molecular; CP - Control Positivo (H37Ra); CN - Control Negativo.

Resultados y Discusión

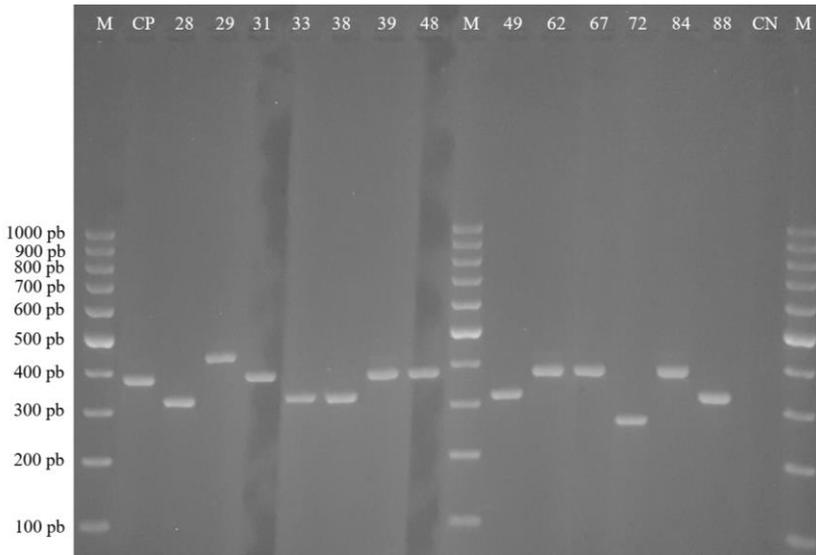


Figura 92. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del *locus* 577 (VNTR 43 o ETRC). Se estudiaron 13 cepas, el control positivo y el control negativo. El prefijo de todas las cepas que aparecen en la figura es CHGUV. Cepa 72: 266 pb (2 repeticiones). Cepa 28, 33, 38, 49 y 88: 324 pb (3 repeticiones). CP y cepa 31, 39, 48, 62, 67 y 84: 382 pb (4 repeticiones). Cepa 29: 440 pb (5 repeticiones). Abreviaturas: M - Marcador de peso molecular; CP - Control Positivo (H37Ra); CN - Control Negativo.

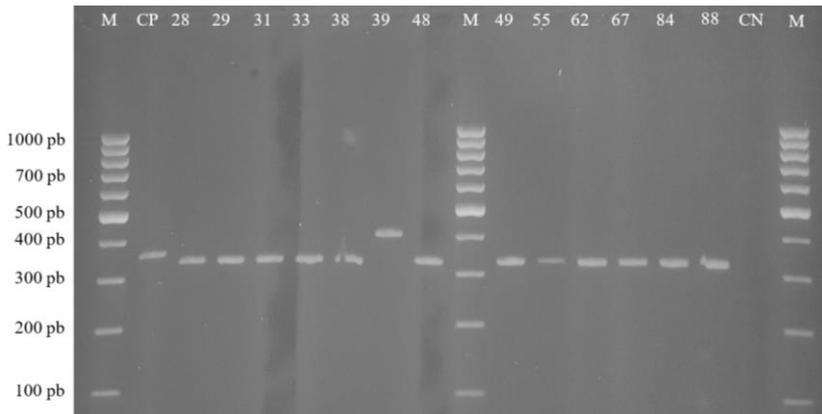


Figura 93. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del *locus* 580 (MIRU 04). Se estudiaron 13 cepas, el control positivo y el control negativo. El prefijo de todas las cepas que aparecen en la figura es CHGUV. Cepa 28, 29, 31, 33, 38, 48, 49, 55, 62, 67, 84 y 88: 329 pb (2 repeticiones). CP: 353 pb (alelo 3')¹². Cepa 39: 406 pb (3 repeticiones). Abreviaturas: M - Marcador de peso molecular; CP - Control Positivo (H37Ra); CN - Control Negativo.

¹²Variante alélica del MIRU 04 para la cepa H37Ra. Véase Apéndice VI: Tabla alélica MIRU-VNTR 24 *loci* descrita por Supply *et al.* (175).

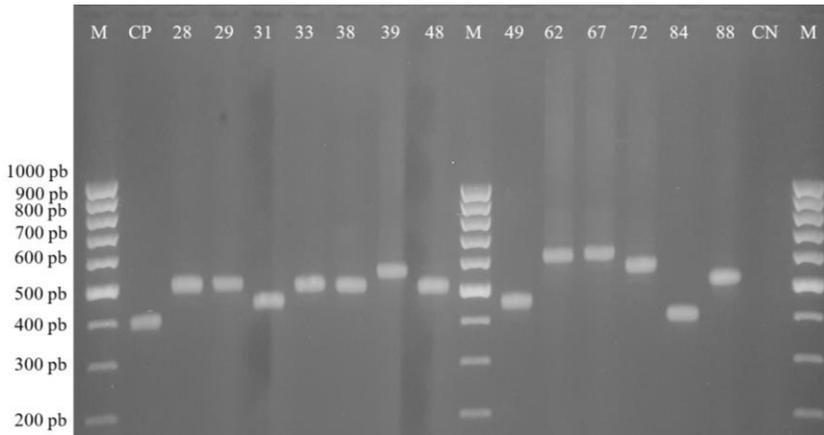


Figura 94. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del locus 802 (MIRU 40).
 Se estudiaron 13 cepas, el control positivo y el control negativo. El prefijo de todas las cepas que aparecen en la figura es CHGUV. CP y cepa 84: 408 pb (1 repetición). Cepa 31 y 49: 462 pb (2 repeticiones). Cepa 28, 29, 33, 38, 48 y 88: 516 pb (3 repeticiones). Cepa 39 y 72: 570 pb (4 repeticiones). Cepa 62 y 67: 624 pb (5 repeticiones). Abreviaturas: M - Marcador de peso molecular; CP – Control Positivo (H37Ra); CN – Control Negativo.

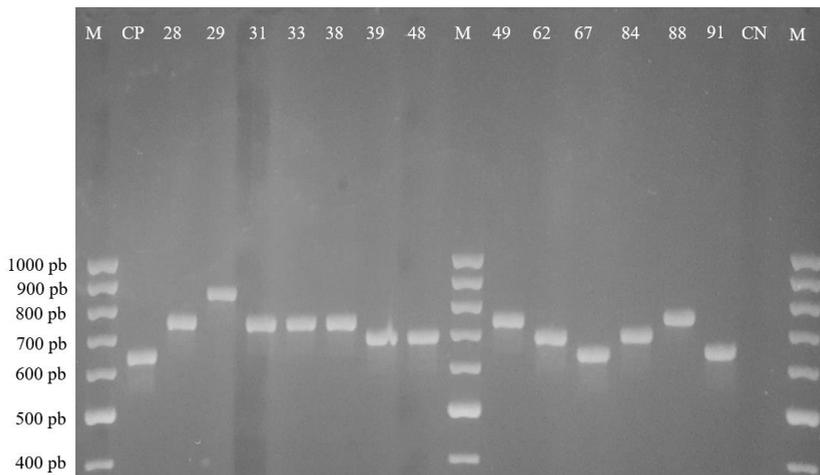


Figura 95. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del locus 960 (MIRU 10).
 Se estudiaron 13 cepas, el control positivo y el control negativo. El prefijo de todas las cepas que aparecen en la figura es CHGUV. CP y Cepa 67 y 91: 643 pb (3 repeticiones). Cepa 39, 48, 62 y 84: 696 pb (4 repeticiones). Cepa 28, 31, 33, 38, 49 y 88: 749 pb (5 repeticiones). Cepa 29: 855 pb (7 repeticiones). Abreviaturas: M - Marcador de peso molecular; CP – Control Positivo (H37Ra); CN – Control Negativo.

Resultados y Discusión

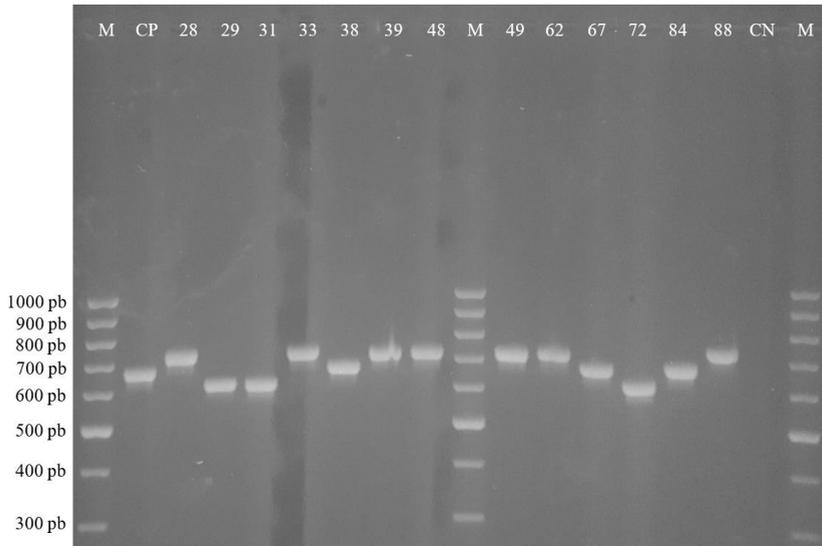


Figura 96. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del locus 1644 (MIRU 16).
Se estudiaron 13 cepas, el control positivo y el control negativo. El prefijo de todas las cepas que aparecen en la figura es CHGUV. Cepa 29, 31, 72: 618 pb (1 repetición). CP y cepa 38, 67 y 84: 671 pb (2 repeticiones). Cepa 28, 33, 39, 48, 49, 62 y 88: 724 pb (3 repeticiones). Abreviaturas: M - Marcador de peso molecular; CP - Control Positivo (H37Ra); CN - Control Negativo.

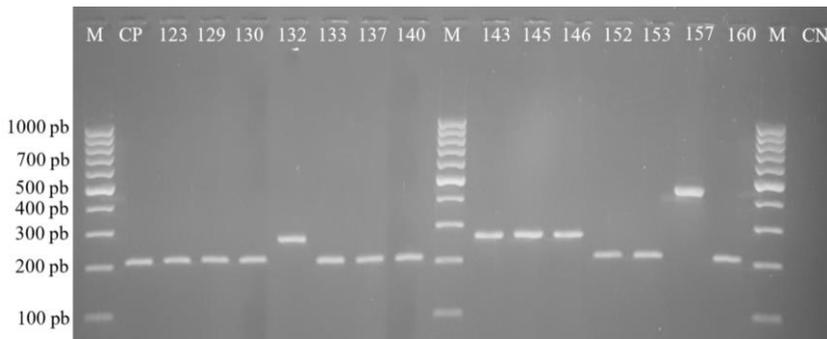


Figura 97. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del locus 1955 (1955 o Mtub 21).
Se estudiaron 14 cepas, el control positivo y el control negativo. El prefijo de todas las cepas que aparecen en la figura es CHGUV. CP y cepa 123, 129, 130, 133, 137, 140, 152, 153 y 160: 206 pb (2 repeticiones). Cepa 132, 143, 145 y 146: 263 pb (3 repeticiones). Cepa 157: 434 pb (6 repeticiones). Abreviaturas: M - Marcador de peso molecular; CP - Control Positivo (H37Ra); CN - Control Negativo.

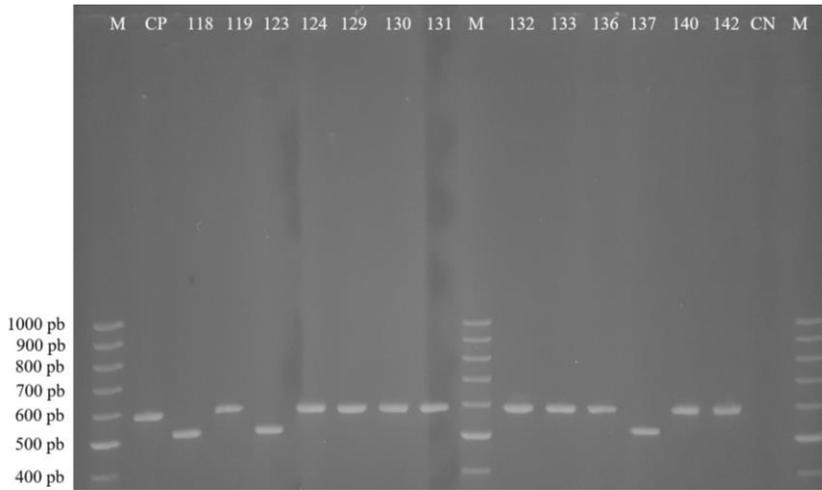


Figura 98. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del locus 2059 (MIRU 20).
 Se estudiaron 13 cepas, el control positivo y el control negativo. El prefijo de todas las cepas que aparecen en la figura es CHGUV. Cepa 118, 123 y 137: 514 pb (1 repetición). CP y cepa 119, 124, 129, 130, 131, 132, 133, 136, 140 y 142: 591 pb (2 repeticiones). Abreviaturas: M - Marcador de peso molecular; CP - Control Positivo (H37Ra); CN - Control Negativo.

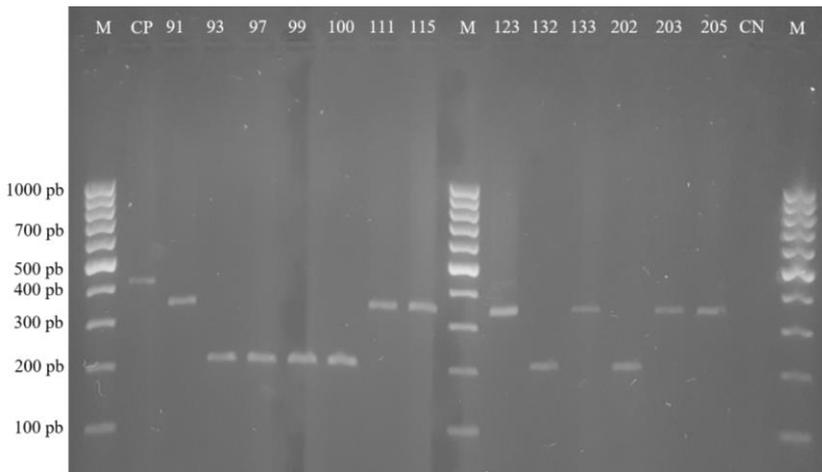


Figura 99. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del locus 2163 (QUB-11b o QUB2163b).
 Se estudiaron 13 cepas, el control positivo y el control negativo. El prefijo de todas las cepas que aparecen en la figura es CHGUV. Cepa 93, 97, 99, 100, 132 y 202: 205 pb (2 repeticiones). Cepa 91, 111, 115, 123, 133, 203 y 205: 343 pb (4 repeticiones). CP: 412 pb (5 repeticiones). Abreviaturas: M - Marcador de peso molecular; CP - Control Positivo (H37Ra); CN - Control Negativo.

Resultados y Discusión

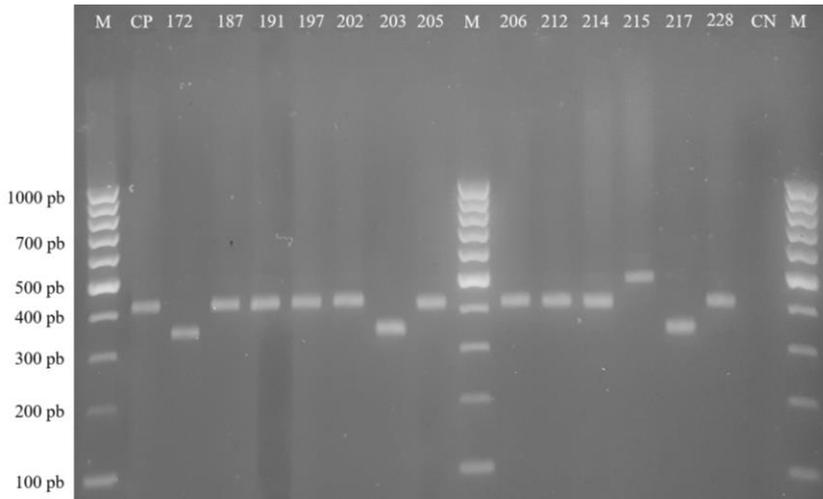


Figura 100. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del *locus* 2165 (ETRA).

Se estudiaron 13 cepas, el control positivo y el control negativo. El prefijo de todas las cepas que aparecen en la figura es CHGUV. Cepa 172, 203 y 217: 345 pb (2 repeticiones). CP y cepa 187, 191, 197, 202, 205, 206, 212, 214 y 228: 420 pb (3 repeticiones). Cepa 215: 495 pb (4 repeticiones). Abreviaturas: M - Marcador de peso molecular; CP - Control Positivo (H37Ra); CN - Control Negativo.

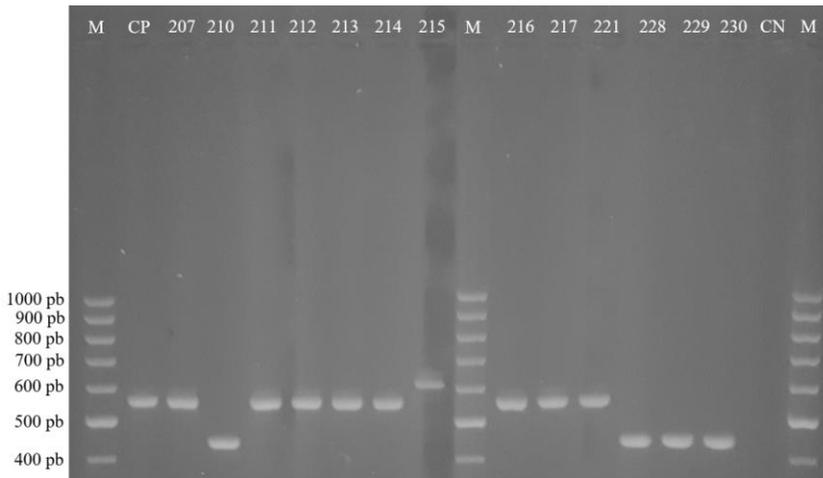


Figura 101. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del *locus* 2347 (VNTR 46 o Mtub 29).

Se estudiaron 13 cepas, el control positivo y el control negativo. El prefijo de todas las cepas que aparecen en la figura es CHGUV. Cepa 210, 228, 229 y 230: 449 pb (2 repeticiones). CP y cepa 207, 211, 212, 213, 214, 216, 217 y 221: 563 pb (4 repeticiones). Cepa 215: 620 pb (5 repeticiones). Abreviaturas: M - Marcador de peso molecular; CP - Control Positivo (H37Ra); CN - Control Negativo.

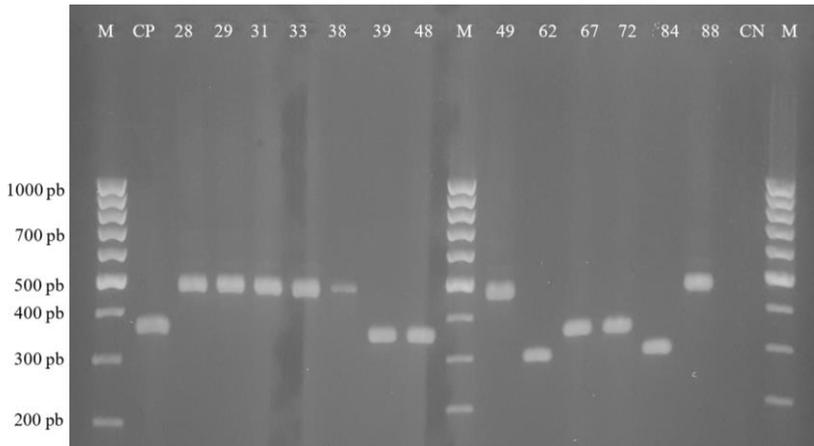


Figura 102. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del *locus* 2401 (VNTR 47 o Mtub 30). Se estudiaron 13 cepas, el control positivo y el control negativo. El prefijo de todas las cepas que aparecen en la figura es CHGUV. Cepa 62 y 84: 305 pb (1 repetición). CP y cepa 39, 48, 67 y 72: 363 pb (2 repeticiones). Cepa 28, 29, 31, 33, 38, 49 y 88: 479 pb (4 repeticiones). Abreviaturas: M - Marcador de peso molecular; CP - Control Positivo (H37Ra); CN - Control Negativo.

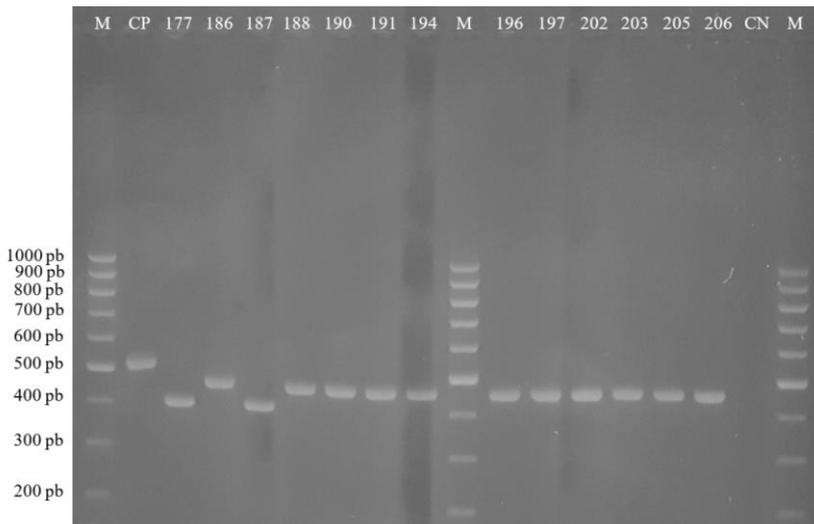


Figura 103. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del *locus* 2461 (VNTR 48 o ETRB). Se estudiaron 13 cepas, el control positivo y el control negativo. El prefijo de todas las cepas que aparecen en la figura es CHGUV. Cepa 177 y 187: 404 pb (1 repetición). Cepa 186, 188, 190, 191, 194, 196, 197, 202, 203, 205 y 206: 461 pb (2 repeticiones). CP: 518 pb (3 repeticiones). Abreviaturas: M - Marcador de peso molecular; CP - Control Positivo (H37Ra); CN - Control Negativo.

Resultados y Discusión

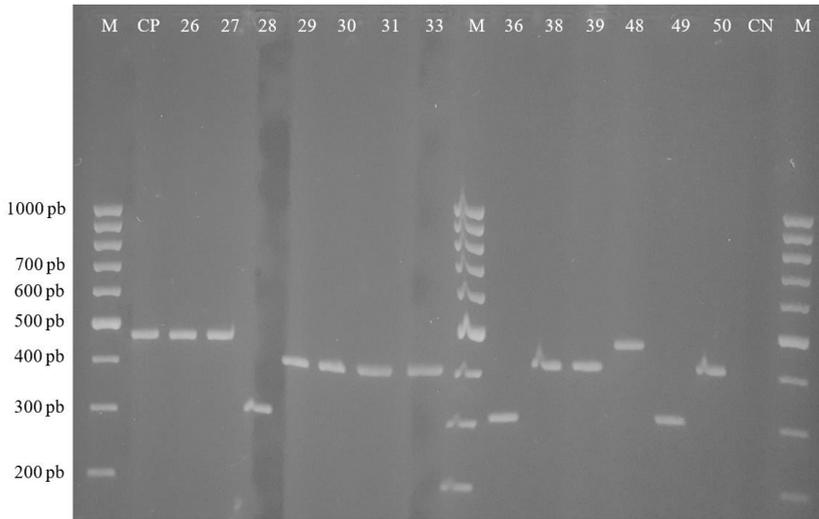


Figura 104. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del *locus* 2531 (MIRU 23). Se estudiaron 13 cepas, el control positivo y el control negativo. El prefijo de todas las cepas que aparecen en la figura es CHGUV. Ceba 28, 36 y 49: 306 pb (3 repeticiones). Ceba 29, 30, 31, 33, 38, 39 y 50: 412 pb (5 repeticiones). CP y cepa 26, 27 y 48: 465 pb (6 repeticiones). Abreviaturas: M - Marcador de peso molecular; CP - Control Positivo (H37Ra); CN - Control Negativo.

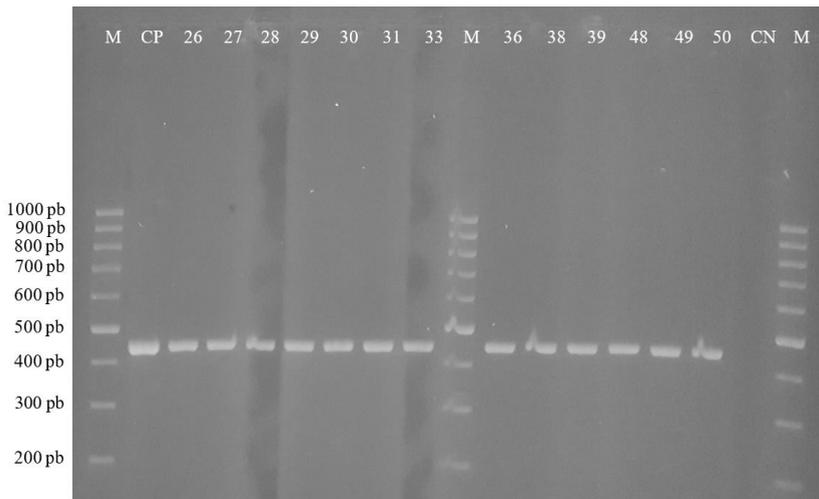


Figura 105. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del *locus* 2687 (MIRU 24). Se estudiaron 13 cepas, el control positivo y el control negativo. El prefijo de todas las cepas que aparecen en la figura es CHGUV. CP y cepa 26, 27, 28, 29, 30, 31, 33, 36, 38, 39, 48, 49 y 50: 447 pb (1 repetición). Abreviaturas: M - Marcador de peso molecular; CP - Control Positivo (H37Ra); CN - Control Negativo.

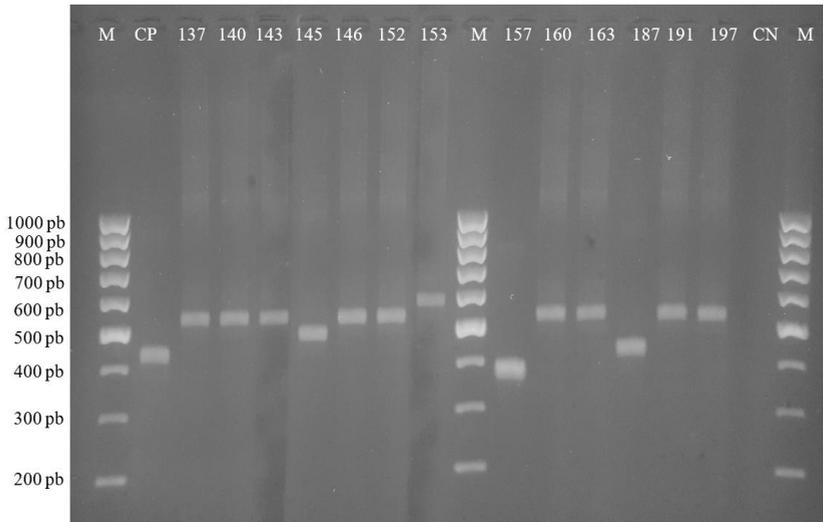


Figura 106. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del *locus* 2996 (MIRU 26). Se estudiaron 13 cepas, el control positivo y el control negativo. El prefijo de todas las cepas que aparecen en la figura es CHGUV. Cepa 157: 387 pb (2 repeticiones). CP y cepa 187: 438 pb (3 repeticiones). Cepa 145: 489 pb (4 repeticiones). Cepa 137, 140, 143, 146, 152, 160, 163, 191 y 197: 540 pb (5 repeticiones). Cepa 153: 591 pb (6 repeticiones). Abreviaturas: M - Marcador de peso molecular; CP - Control Positivo (H37Ra); CN - Control Negativo.

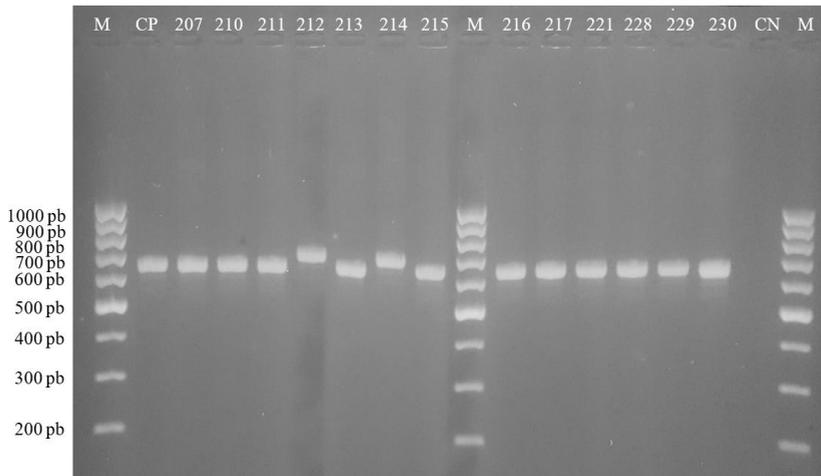


Figura 107. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del *locus* 3007 (MIRU 27 o QUB-5). Se estudiaron 13 cepas, el control positivo y el control negativo. El prefijo de todas las cepas que aparecen en la figura es CHGUV. CP y cepa 207, 210, 211, 213, 215, 216, 217, 221, 228, 229 y 230: 657 pb (3 repeticiones). Cepa 212 y 214: 710 pb (4 repeticiones). Abreviaturas: M - Marcador de peso molecular; CP - Control Positivo (H37Ra); CN - Control Negativo.

Resultados y Discusión

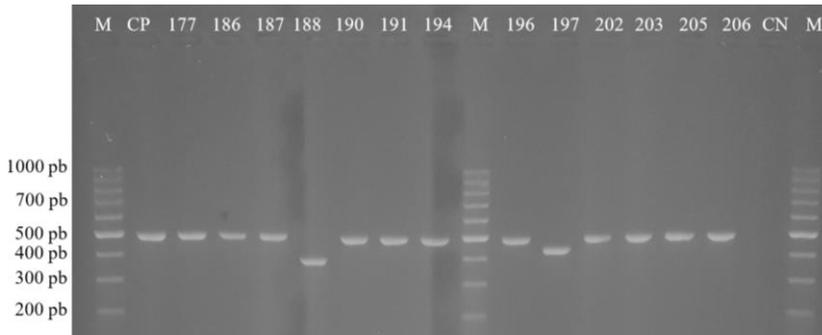


Figura 108. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del *locus* 3171 (VNTR 49 o Mtub 34). Se estudiaron 13 cepas, el control positivo y el control negativo. El prefijo de todas las cepas que aparecen en la figura es CHGUV. Cepa 188: 380 pb (1 repetición). Cepa 197: 434 pb (2 repeticiones). CP y cepa 177, 186, 187, 190, 191, 194, 196, 202, 203, 205 y 206: 488 pb (3 repeticiones). Abreviaturas: M - Marcador de peso molecular; CP - Control Positivo (H37Ra); CN - Control Negativo.

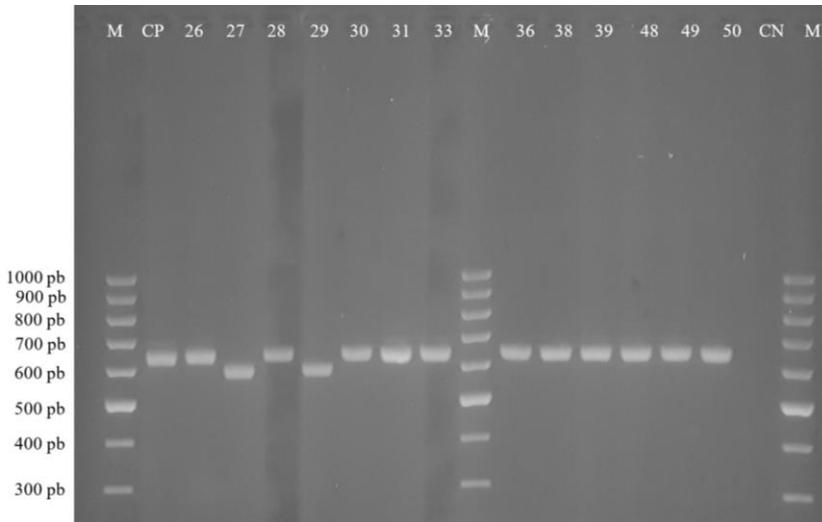


Figura 109. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del *locus* 3192 (MIRU 31 o ETRE). Se estudiaron 13 cepas, el control positivo y el control negativo. El prefijo de todas las cepas que aparecen en la figura es CHGUV. Cepa 27 y 29: 598 pb (2 repeticiones). CP y cepa 26, 28, 30, 31, 33, 36, 38, 39, 48, 49 y 50: 651 pb (3 repeticiones). Abreviaturas: M - Marcador de peso molecular; CP - Control Positivo (H37Ra); CN - Control Negativo.

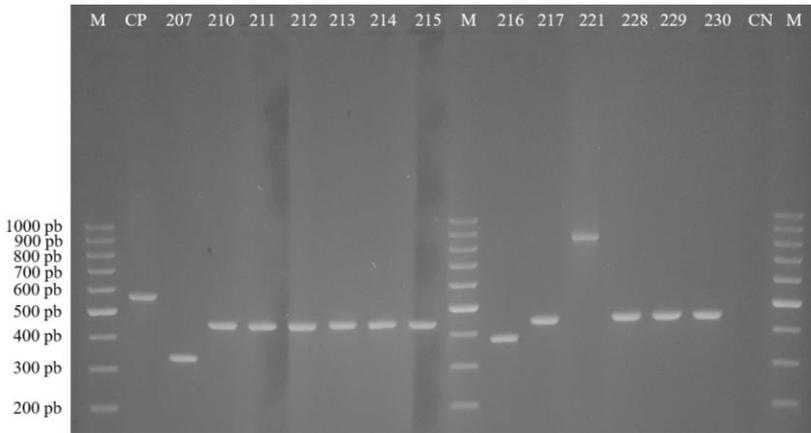


Figura 110. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del *locus* 3690 (VNTR 52 o Mtb 39). Se estudiaron 13 cepas, el control positivo y el control negativo. El prefijo de todas las cepas que aparecen en la figura es CHGUV. Cepa 207: 330 pb (1 repetición). Cepa 216: 388 pb (2 repeticiones). Cepa 210, 211, 212, 213, 214, 215, 217, 228, 229 y 230: 446 pb (3 repeticiones). CP: 562 pb (5 repeticiones). Cepa 221: 852 pb (10 repeticiones). Abreviaturas: M - Marcador de peso molecular; CP – Control Positivo (H37Ra); CN – Control Negativo.

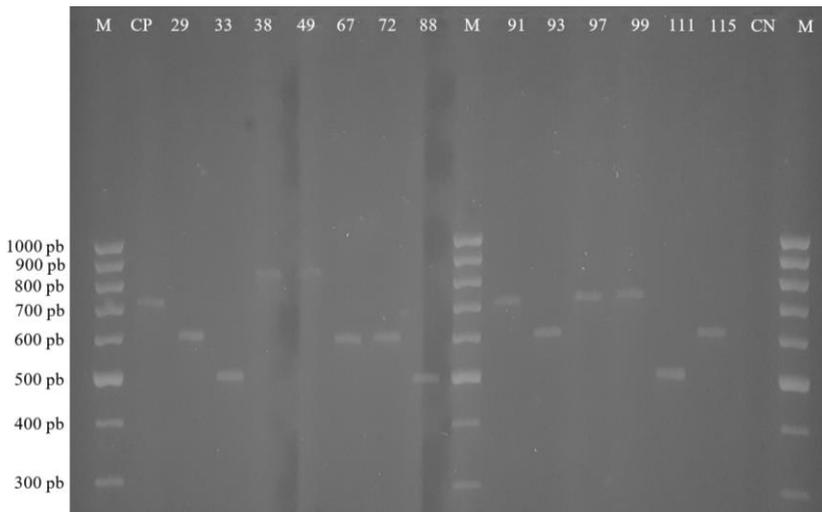


Figura 111. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del *locus* 4052 (QUB-26). Se estudiaron 13 cepas, el control positivo y el control negativo. El prefijo de todas las cepas que aparecen en la figura es CHGUV. Cepa 33, 88 y 111: 486 pb (3 repeticiones). Cepa 29, 67, 72, 93 y 115: 597 pb (4 repeticiones). CP y cepa 91, 97 y 99: 708 pb (5 repeticiones). 38 y 49: 819 pb (6 repeticiones). Abreviaturas: M - Marcador de peso molecular; CP – Control Positivo (H37Ra); CN – Control Negativo.

Resultados y Discusión

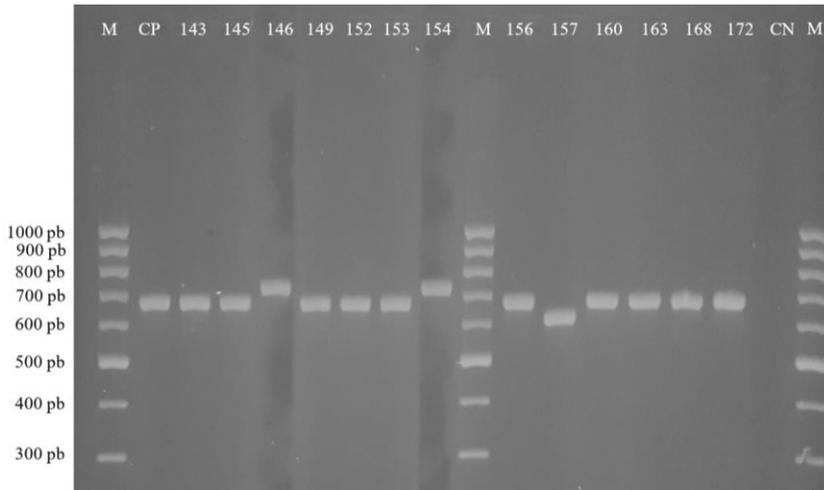


Figura 112. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del locus 4156 (VNTR 53 o QUB4156). Se estudiaron 13 cepas, el control positivo y el control negativo. El prefijo de todas las cepas que aparecen en la figura es CHGUV. Cepa 157: 622 pb (1 repetición). CP y cepa 143, 145, 149, 152, 153, 156, 160, 163, 168 y 172: 681 pb (2 repeticiones). Cepa 146 y 154: 740 pb (3 repeticiones). Abreviaturas: M - Marcador de peso molecular; CP - Control Positivo (H37Ra); CN - Control Negativo.

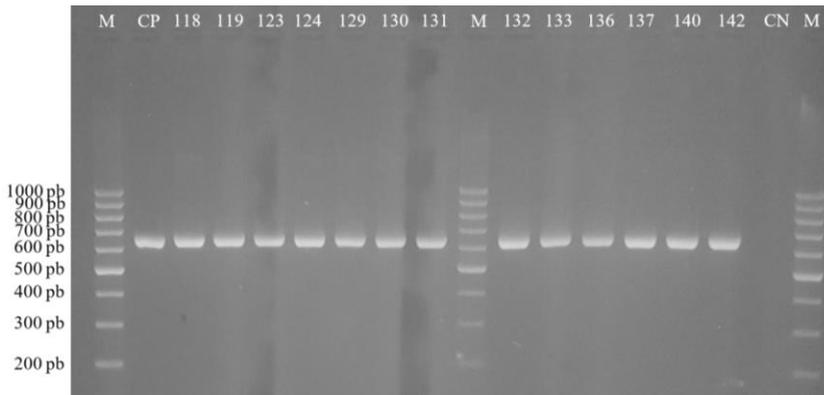


Figura 113. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del locus 4348 (MIRU 39). Se estudiaron 13 cepas, el control positivo y el control negativo. El prefijo de todas las cepas que aparecen en la figura es CHGUV. CP y cepa 118, 119, 123, 124, 129, 130, 131, 132, 133, 136, 137, 140 y 142: 646 pb (2 repeticiones). Abreviaturas: M - Marcador de peso molecular; CP - Control Positivo (H37Ra); CN - Control Negativo.

Después de la asignación alélica de los 24 loci para cada cepa, los datos se subieron a la plataforma *on-line* MIRU-VNTRplus. De los 154 aislados clínicos (no se toma en cuenta el control positivo) 55 de ellos ya disponían de nomenclatura en esta base de datos (35,7%). Mientras que, a los 99 aislados restantes (64,3%) se les asignó nomenclatura nueva. Véase el Apéndice IX: Nomenclatura MLVA Mtbc15-9 de los genotipos MIRU-VNTR estudiados.

4.7.2.1 Frecuencia y diversidad alélica

La frecuencia alélica de cada *locus* estudiado se muestra en el Apéndice X. Globalmente, el número de repeticiones varía de 0 a 30, aunque la mayoría (99,84%) se encuentra entre 0 y 10 repeticiones. Según el número de alelos por *locus*, los más variables fueron el 802 (MIRU 40), 2163 (QUB-11b), 3690 (VNTR 52) y 4052 (QUB-26) con 10 alelos cada uno. Seguidos del *locus* 2996 (MIRU 26) con 9. En contraposición, el menos variable fue el 2059 (MIRU 20) con dos alelos y, posteriormente, los *loci* 154 (MIRU 02), 2687 (MIRU 24) y 3171 (MIRU 49) con tres.

Por otro lado, la plataforma *on-line* MIRU-VNTR*plus* permite el cálculo de la diversidad alélica de cada *locus*, la cual determina cómo de variable es un *locus*. También recibe el nombre de poder discriminatorio, puesto que cuanto más variable es un *locus* mayor será la probabilidad de que dos cepas presenten un alelo diferente en dicho *locus*. Los datos obtenidos en nuestro análisis se muestran en la Figura 114. Según estos datos, los *loci* más polimórficos son el 2163 (QUB-11b) y el 4052 (QUB-26), seguidos del 802 (MIRU 40). Son, por tanto, los *loci* con mayor poder discriminatorio. Mientras que, el menos polimórfico es el 2687 (MIRU 24), seguido del 4348 (MIRU 39) y el 154 (MIRU 02). Siendo estos los que presentan menor poder discriminatorio.

Statistics For *Browse Database Table*

Strain Count

Number of user strains: 155
Number of reference strains: 0

Clustering Rate

Clustering rate MIRU-VNTR: 0.17419355
Clustering rate Spoligo: NaN

Allelic Diversity

154 MIRU02	: 0.17	960 MIRU10	: 0.72	2165 ETRA	: 0.6	2687 MIRU24	: 0.04	3690 Mtub39	: 0.65
424 Mtub04	: 0.57	1644 MIRU16	: 0.6	2347 Mtub29	: 0.28	2996 MIRU26	: 0.42	4052 QUB26	: 0.79
577 ETRC	: 0.58	1955 Mtub21	: 0.63	2401 Mtub30	: 0.63	3007 MIRU27	: 0.23	4156 QUB4156	: 0.48
580 MIRU04	: 0.47	2059 MIRU20	: 0.27	2461 ETRB	: 0.2	3171 Mtub34	: 0.39	4348 MIRU39	: 0.14
802 MIRU40	: 0.77	2163b QUB11b	: 0.79	2531 MIRU23	: 0.66	3192 MIRU31	: 0.31		

Figura 114. Diversidad alélica calculada por la plataforma *on-line* MIRU-VNTR*plus*, a partir de las 155 cepas analizadas.

4.7.2.2 Determinación de patrones agrupados y únicos

Para determinar la presencia de patrones agrupados y únicos dentro de las 155 cepas tipificadas mediante MIRU-VNTR de 24 *loci*, se realizó un árbol de mínima expansión (*Minimum Spanning Tree* - MST) a través de la plataforma *on-line* MIRU-VNTR*plus*. Los datos a partir de este árbol se analizaron en

función de si el número de *loci* diferentes entre cepas fue como máximo dos, uno o no existía diferencia (idéntico mirutipo). Véase la Figura 117 (diferencia máxima de dos *loci*), la Figura 118 (diferencia máxima de un *locus*) y la Figura 119 (idéntico mirutipo).

En este estudio consideramos que la detección de complejos clonales con una diferencia máxima de dos *loci* sería el algoritmo más sensible para detectar agrupamientos desde el punto de vista de la epidemiología molecular con la tipificación MIRU. Con lo cual, los complejos clonales con una diferencia máxima de dos *loci* se verán en primer lugar y se compararán respecto a los otros dos ($\neq 1$ *locus* y $\neq 0$ *loci*). Para facilitar la interpretación de los complejos clonales (CC) encontrados en función de la diferencia de *loci* (2, 1 o 0) se mantiene la misma denominación asignada a los complejos clonales que presentan una diferencia máxima de dos *loci*.

Teniendo en cuenta los agrupamientos con una diferencia máxima entre cepas de dos *loci*, el número de CC detectados fue de 22. Dichos CC engloban al 50,32% de los aislados clínicos estudiados ($n = 78$). El 49,68% restante fueron patrones únicos ($n = 77$). La distribución de las cepas entre los distintos CC se representa en la Figura 115. Los CC que en ella se observa, presentan un mínimo de 2 cepas y un máximo de 12.

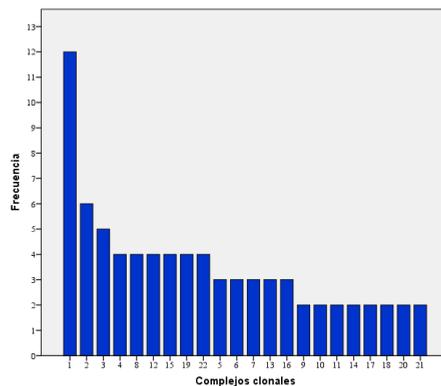


Figura 115. Número de cepas presentes en cada complejo clonal. Asignación mediante MIRU-VNTR 24 *loci*, con una diferencia máxima de 2 *loci*.

En cambio, si se restringe la diferencia entre cepas pertenecientes a un mismo agrupamiento a 1 *locus* como máximo, se obtienen 20 CC (máximo de 10 cepas y mínimo de 2) con un porcentaje de cepas agrupadas del 40,00% ($n = 62$; véase la Figura 116). Y si solo se considera como complejo clonal aquellas cepas con idéntico mirutipo, se detectan 20 CC (máximo de 4 cepas y mínimo de 2) con un 30,32% de cepas agrupadas ($n = 47$; véase la Figura 116). Los dos CC con mayor número de cepas, el CC1 y el CC2, obtenidos con el umbral de como máximo dos *loci* de diferencia, se distribuyen en tres y dos CC, respectivamente, cuando se toma como umbral el mismo mirutipo (véase la Figura 119).

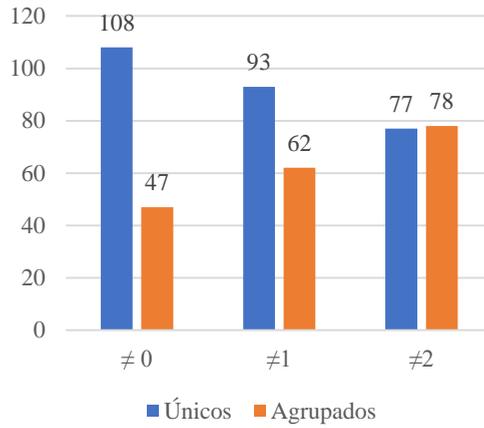


Figura 116. Diagrama de barras con las frecuencias absolutas de las cepas agrupadas o no en función del umbral establecido a la hora de asignar los complejos clonales: idéntico mirutipo ($\neq 0$), diferencia máxima de 1 locus ($\neq 1$) o diferencia máxima de 2 loci ($\neq 2$). Tipificación mediante MIRU-VNTR 24 loci.

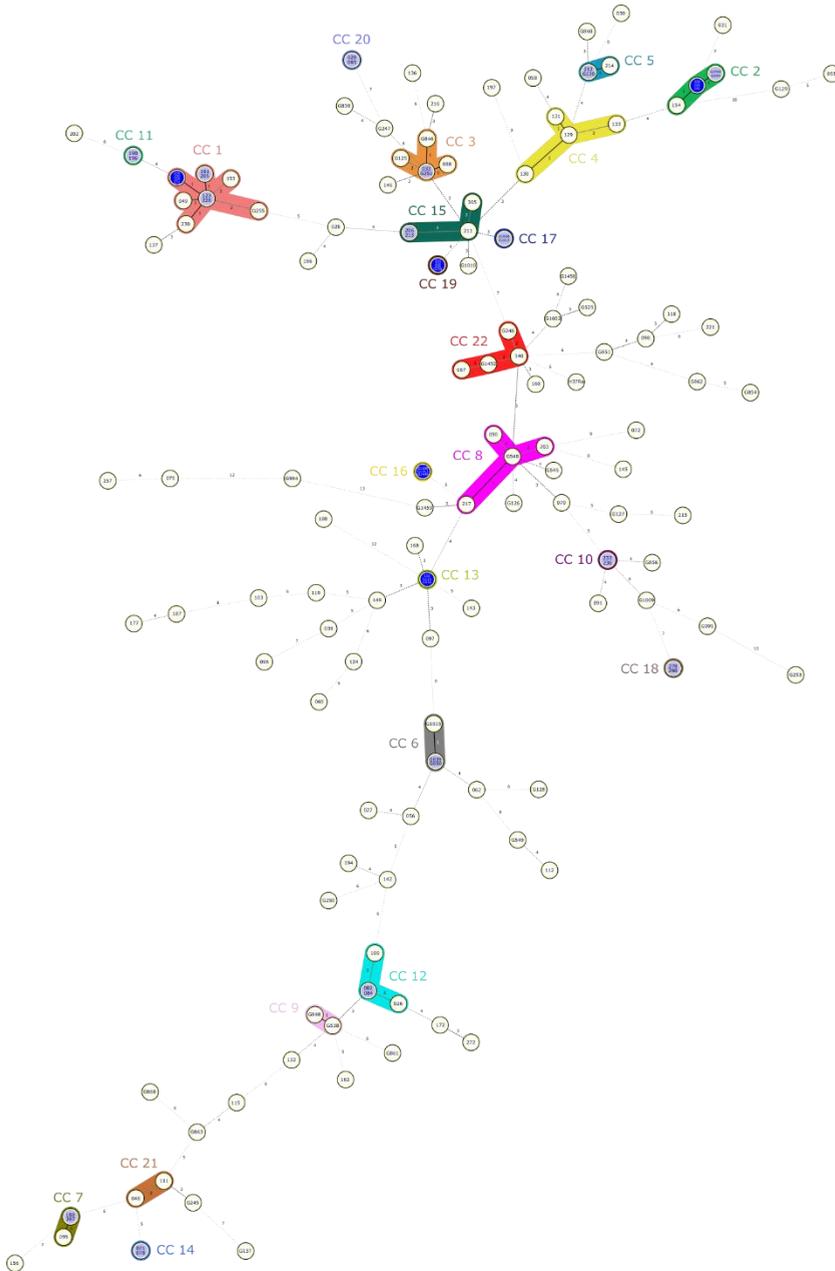


Figura 117. Árbol de mínima expansión construido a partir de los aislados estudiados mediante MIRU-VNTR 24 loci, con una diferencia máxima entre complejos clonales (CC) de 2 loci. Obtenida de la plataforma *on-line* MIRU-VNTRplus y adaptada posteriormente mediante el programa Inkscape.

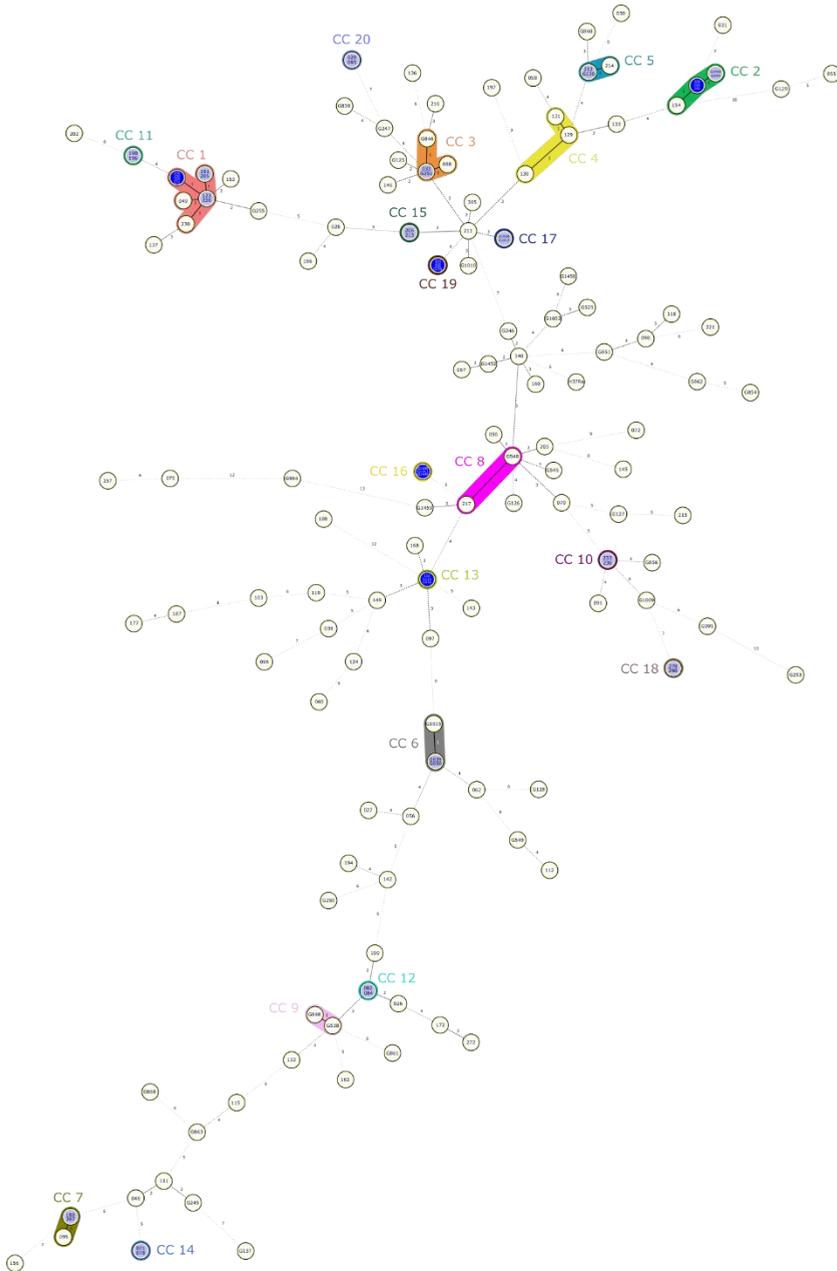


Figura 118. Árbol de mínima expansión construido a partir de los aislados estudiados mediante MIRU-VNTR 24 *loci*, con una diferencia máxima entre complejos clonales (CC) de 1 *locus*.

Obtenida de la plataforma *on-line* MIRU-VNTRplus y adaptada posteriormente mediante el programa Inkscape.

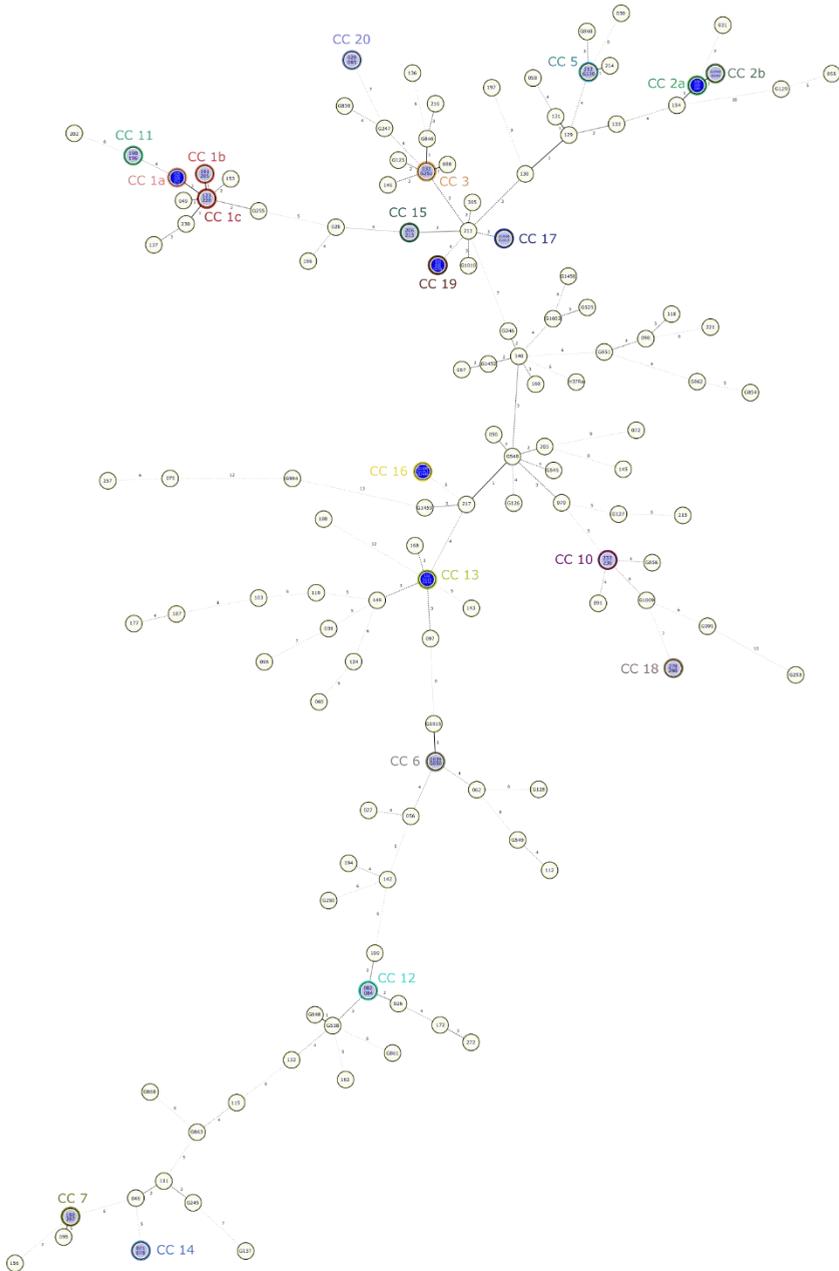


Figura 119. Árbol de mínima expansión construido a partir de los aislados estudiados mediante MIRU-VNTR 24 *loci*. Los complejos clonales (CC) descritos presentan el mismo mirutipo. Obtenida de la plataforma *on-line* MIRU-VNTR*plus* y adaptada posteriormente mediante el programa Inkscape.

En la Tabla 32 se muestra la detección de los CC en función del umbral establecido (Véase también la Figura 117, la Figura 118 y la Figura 119). A partir de la cual, se intentan averiguar los posibles nexos epidemiológicos que permitan confirmar los CC descritos mediante epidemiología molecular.

Tabla 32. Detección de complejos clonales mediante MIRU-VNTR 24 *loci* en las cepas estudiadas en función del umbral establecido: idéntico mirutipo ($\neq 0$), diferencia máxima de 1 *locus* ($\neq 1$) o diferencia máxima de 2 *loci* ($\neq 2$).

Leyenda: “;” separa cepas con distinto mirutipo; “-” separa cepas con idéntico mirutipo; tipología **negrita con sombreado amarillo** – idéntico mirutipo; tipología normal con sombreado amarillo - diferencia máxima de 1 *locus*; tipología normal - diferencia máxima de 2 *loci*. Abreviaturas: CC – Complejo clonal; ID – Identificación.

CC	n ($\neq 0$)	n ($\neq 1$)	n ($\neq 2$)	ID Cepas
#1	8	10	12	036-210-229-231; 191-205; 123-228; 049; 230; 153; G255
#2	5	6	6	038-269-280; G1590-G249; 154
#3	2	4	5	033-G251; 088; G846; G125
#4	0	3	4	129; 130; 131; 133
#5	2	3	3	212-G130; 214
#6	2	3	3	G839-G850; G1015
#7	2	3	3	188-207; 099
#8	0	2	4	217; G548; 050; 203
#9	0	2	2	G538; G848
#10	2	2	2	233-236
#11	2	2	2	190-196
#12	2	2	4	082-084; 026; 100
#13	3	3	3	152-G135-G536
#14	2	2	2	071-078
#15	2	2	4	206-213; 211; 305
#16	3	3	3	G1008-G1011-G1449
#17	2	2	2	G1000-G1012
#18	2	2	2	278-298
#19	4	4	4	331-332-336-G256
#20	2	2	2	029-093
#21	0	0	2	048; 111
#22	0	0	4	067; 140; G246; G1452
Total	47	62	78	

Complejo clonal 1

Este CC está formado por doce cepas (Figura 117, Tabla 32), teniendo en cuenta una diferencia máxima de dos *loci*, las cuales se aislaron de doce pacientes distintos sin ninguna relación epidemiológica evidente. Dentro de esta agrupación, se observa a su vez tres subgrupos con el mismo mirutipo, uno de cuatro cepas y dos de dos cepas, correspondientes a los CC 1a, 1b y 1c de la Figura 119, respectivamente. Todas las cepas se aislaron entre el año 2009 y 2010, excepto la cepa ICHGUV255 que se aisló en 2014. Se estudió la localización geográfica de los pacientes según el área de atención primaria asignada, la cual se muestra en la Figura 120. Todos los casos se distribuyen

Resultados y Discusión

en un radio de 10 km. El 75% de las cepas se aislaron de pacientes españoles, mientras que el 25% restante (n = 3) procedían de pacientes nacidos en Argelia, Marruecos y Senegal. El 100% de las cepas de este CC se asignaron al linaje 4.1.2 (mediante tipado de SNP) y ninguna de las cepas presentó resistencia (ni fenotípica ni genotípica).

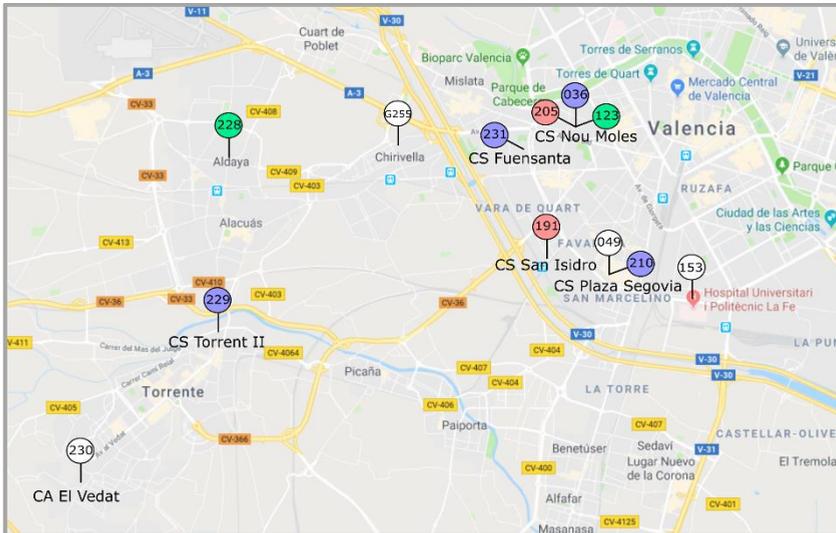


Figura 120. Disposición geográfica de los casos de tuberculosis del CC 1 en función del área de atención primaria de cada caso.

El color de los casos hace referencia a los subgrupos con idéntico mirutipo encontrados dentro del CC, mientras que el color blanco indica diferente mirutipo. Prefijos: sin prefijo = CHGUV; G = ICHGUV. Fuente del mapa: Google Maps. Modificado mediante el programa Inkscape.

Complejo clonal 2

Está formado por seis cepas con una diferencia máxima de dos *loci* (Figura 117 y Tabla 32), procedentes de cinco pacientes. Las cepas CHGUV038 y la ICHGUV249 se aislaron de sendos esputos pertenecientes a un mismo paciente (paciente A), con una diferencia de tiempo entre ellas de cinco años y dos meses. Esto se traduce en una diferencia de un *locus* mediante MIRU-VNTR 24 *loci*. Además, la cepa ICHGUV249 presenta el mismo mirutipo que la cepa ICHGUV1590 (CC 2b), perteneciente a un familiar de segundo grado no conviviente (paciente B, hermano del paciente A). La cepa ICHGUV1590 fue aislada en enero de 2013 y la ICHGUV249 en junio de 2014. En cuanto al resto de pacientes pertenecientes al CC, no se estableció ninguna relación epidemiológica evidente, salvo que el paciente de la cepa CHGUV269 pertenecía a la misma área de atención primaria que los dos casos anteriormente comentados (véase Figura 121). El resto de los casos se distribuyen en un radio de 10 km. Dentro del CC se encontraron 2 subgrupos

con el mismo mirutipo, compuestos por tres y dos cepas, correspondientes a los CC 2a y 2b de la Figura 119, respectivamente.

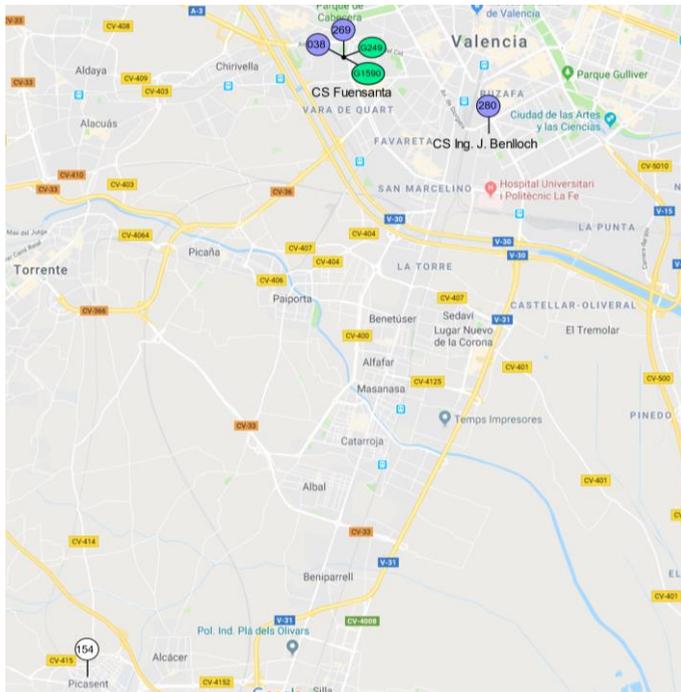


Figura 121. Disposición geográfica de los casos de tuberculosis del CC 2 en función del área de atención primaria de cada caso.

El color de los casos hace referencia a los subgrupos con idéntico mirutipo encontrados dentro del CC (color blanco = diferente mirutipo). Prefijos: sin prefijo = CHGUV; G = ICHGUV. Fuente del mapa: Google Maps. Modificado mediante el programa Inkscape.

Por lo que respecta al año de aislamiento, todas las cepas se aislaron entre el año 2009 y 2010, excepto las cepas ICHGUV249 y ICHGUV1590 (indicado en el párrafo anterior). El 100% de las cepas proceden de pacientes autóctonos, perteneciendo todas ellas al linaje 4.1.2 (por tipado de SNP).

En lo referente a la resistencia frente a los fármacos antituberculosos, se detectó resistencia en las cepas ICHGUV1590 y ICHGUV249 (CC 2b). En la primera de ellas se detectó resistencia genotípica frente a rifampicina mediante WGS (mutación I491F que afecta al gen *rpoB*; visto en el apartado 4.6.2.2). Mientras que, en la segunda, además de la misma mutación en el gen *rpoB*, se detectó resistencia fenotípica y genotípica a isoniazida (mutación G273R del gen *katG* detectada por WGS, visto en los apartados 4.6.1 y 4.6.2.2). Según lo comentado anteriormente sobre estos dos casos, y sabiendo que la cepa ICHGUV249 inicialmente era sensible (CHGUV038), se podría inferir que el paciente B (cepa ICHGUV1590) probablemente se infectase durante el episodio de recaída del paciente A. Aunque se desconoce el sentido de la

La distribución geográfica, según el área de atención primaria asignada, de todos los casos se enmarca en un radio de 50 km (Figura 122). Todos los casos fueron autóctonos. Las cepas se asignaron al linaje 4.1.2 (tipado de SNP) y ninguna presentó resistencia (ni fenotípica ni genotípica).

Complejo clonal 4

Según el umbral de como máximo dos *loci*, el CC 4 está compuesto por cuatro cepas (Figura 117, Tabla 32), pertenecientes a cuatro pacientes diferentes sin una evidente relación epidemiológica entre ellos. Todas las cepas se aislaron en octubre de 2009. Se estudió la localización geográfica de los pacientes según el área de atención primaria asignada, la cual se muestra en la Figura 123. Todos los casos se distribuyen en un radio de 8,5 km. Los aislados se obtuvieron de pacientes españoles, el 100% de las cepas se asignaron al linaje 4.1.2 (por tipado de SNP) y ninguna presentó resistencia.

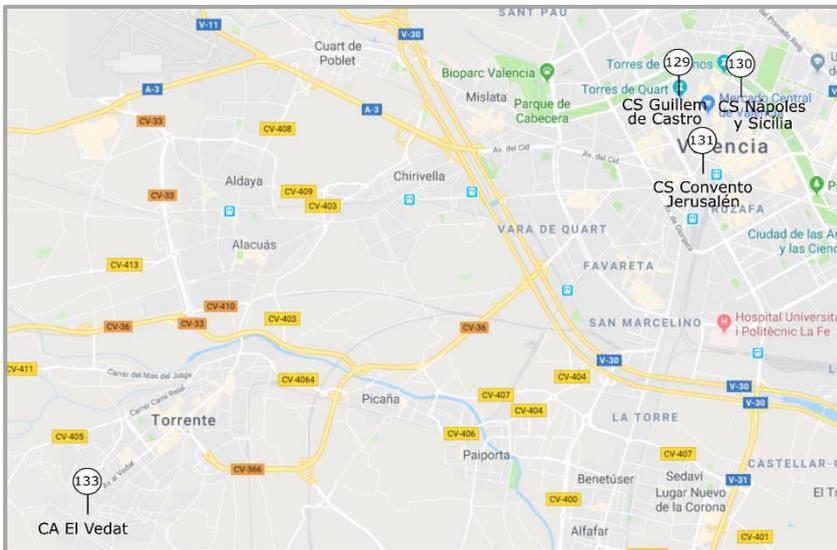


Figura 123. Disposición geográfica de los casos de tuberculosis del CC 4 en función del área de atención primaria de cada caso. Prefijos = CHGUV. Fuente del mapa: Google Maps. Modificado mediante el programa Inkscape.

Complejo clonal 5

Este CC está formado por tres cepas (Figura 117, Tabla 32), con una diferencia máxima de dos *loci*, procedentes de tres pacientes distintos sin relación epidemiológica evidente. Las cepas CHGUV212 y ICHGUV130 generaron el mismo mirutipo, con una diferencia de tiempo entre ellas de cuatro años (2010 y 2014, respectivamente). La otra cepa se obtuvo en el mismo año que la cepa CHGUV212. Se estudió la localización geográfica de los pacientes según el área de atención primaria asignada, la cual se muestra

en la Figura 124. Todos los casos se distribuyen en un radio de 12 km. Las cepas se aislaron de pacientes españoles, se asignaron al linaje 4.1.2 (por tipado de SNP) y ninguna presentó resistencia.

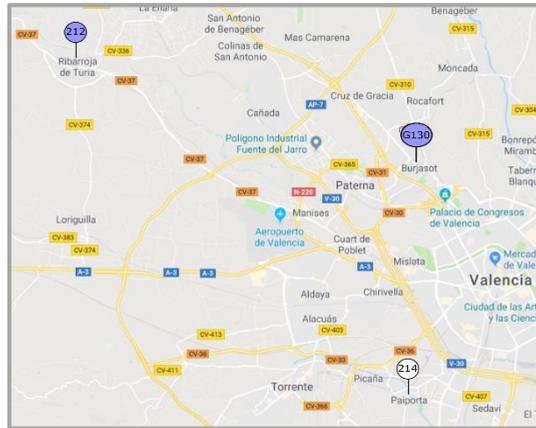


Figura 124. Disposición geográfica de los casos de tuberculosis del CC 5 en función del área de atención primaria de cada caso.

El color morado de los casos hace referencia a los subgrupos con idéntico mirutipo encontrados dentro del CC, mientras que el color blanco indica diferente mirutipo. Prefijos: sin prefijo = CHGUV; G = ICHGUV. Fuente del mapa: Google Maps. Modificado mediante el programa Inkscape.

Complejo clonal 6

Integrado por tres cepas (Figura 117, Tabla 32), con una diferencia máxima de dos *loci*, procedentes de pacientes distintos sin ninguna relación epidemiológica evidente. Las cepas ICHGUV839 y ICHGUV850 obtuvieron el mismo tipado por MIRU. Todas las cepas se aislaron entre 2014 y 2015. Los tres casos se agrupan geográficamente en un radio de 1,3 km, teniendo en cuenta su área de atención primaria asignada (Figura 125).



Figura 125. Disposición geográfica de los casos de tuberculosis del CC 6 en función del área de atención primaria de cada caso.

El color morado de los casos hace referencia a los subgrupos con idéntico mirutipo encontrados dentro del CC, mientras que el color blanco indica diferente mirutipo. Prefijos: G = ICHGUV. Fuente del mapa: Google Maps. Modificado mediante el programa Inkscape.

Todos los casos fueron de pacientes nacidos fuera de España: dos de ellos nacidos en Bolivia y uno en Ecuador, con una estancia superior a los 10 años cada uno. El 100% de las cepas de este CC se asignaron al linaje 4.3 (mediante tipado de SNP) y ninguna de las cepas presentó resistencia (ni fenotípica ni genotípica).

Complejo clonal 7

El CC 7 está compuesto por tres cepas de tres pacientes distintos, con una diferencia máxima de dos *loci* (Figura 117, Tabla 32). No se halló ninguna relación epidemiológica evidente. Las cepas CHGUV188 y CHGUV207 tuvieron el mismo patrón MIRU y se aislaron en 2010. La cepa restante, CHGUV099, se aisló un año antes. Los casos se engloban en un área de 5 km, según el área de atención primaria asignada (Figura 126). Todos los pacientes eran autóctonos y las cepas se clasificaron mediante tipado de SNP como linaje 4.3. No se encontró resistencia a los antituberculosos en ninguna de ellas.



Figura 126. Disposición geográfica de los casos de tuberculosis del CC 7 en función del área de atención primaria de cada caso.

El color morado de los casos hace referencia a los subgrupos con idéntico mirutipo encontrados dentro del CC, mientras que el color blanco indica diferente mirutipo. Prefijos = CHGUV. Fuente del mapa: Google Maps. Modificado mediante el programa Inkscape.

Complejo clonal 8

El CC 8 está formado por cuatro cepas (Figura 117, Tabla 32), teniendo en cuenta una diferencia máxima de dos *loci*, que proceden de cuatro pacientes diferentes. No se estableció ninguna relación epidemiológica evidente entre ellos. Todas las cepas se aislaron entre el año 2009 y 2010, excepto la cepa ICHGUV548 que se aisló en 2015. Se estudió la localización geográfica de los pacientes según el área de atención primaria asignada, la cual se muestra en la Figura 127. Los casos se distribuyen en un radio de 21,5 km y todas las cepas se aislaron de pacientes españoles. El 100% de las cepas de este CC se asignaron al linaje 4.10 (por tipado de SNP) y ninguna de las cepas presentó resistencia. Cabe destacar que en la cepa ICHGUV548 se detectó una mutación silenciosa en el gen *rpoB* (TTC/TTT, F514F, para más información véase el apartado 4.6.2.1) sin afectación fenotípica, que no fue detectada en la cepa

Resultados y Discusión

CHGUV217, distanciadas entre sí por un único *locus*. La diferencia de tiempo entre estas dos cepas fue de casi cinco años.

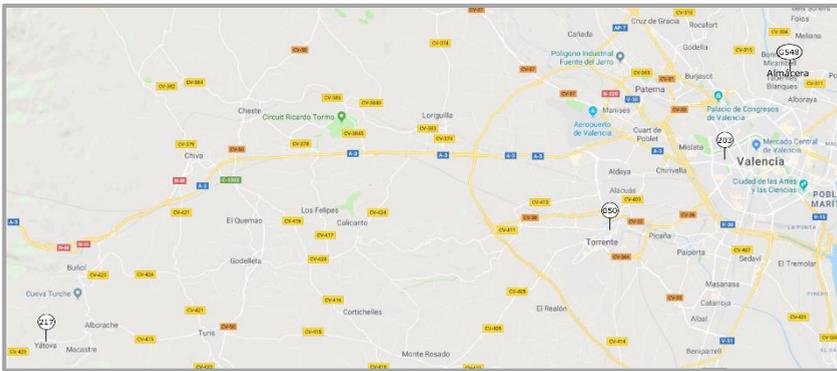


Figura 127. Disposición geográfica de los casos de tuberculosis del CC 8 en función del área de atención primaria de cada caso.

Prefijos: sin prefijo = CHGUV; I = ICHGUV. Fuente del mapa: Google Maps. Modificado mediante el programa Inkscape.

Complejo clonal 9

Compuesto por dos cepas separadas entre ellas por un *locus* de diferencia (Figura 117, Tabla 32), pertenecientes a dos pacientes diferentes. No se halló ninguna relación epidemiológica evidente. La cepa ICHGUV538 y la ICHGUV848 se aislaron en 2014 y 2015, respectivamente. Los dos casos se dieron en la misma ciudad, pero los pacientes estaban asignados a centros de atención primaria distintos (Figura 128). Ambos casos fueron en pacientes autóctonos. Las cepas pertenecían al linaje 4.3 y no se detectó resistencia.



Figura 128. Disposición geográfica de los casos de tuberculosis del CC9 en función del área de atención primaria de cada caso.

Prefijos: G = ICHGUV. Fuente del mapa: Google Maps. Modificado mediante el programa Inkscape.

Complejo clonal 17

Está formado por dos cepas con el mismo mirutipo (Figura 117, Tabla 32), de pacientes distintos. No existe relación epidemiológica entre ellos. Los dos casos se distribuyen en un radio de 3,3 km, según el área de atención primaria asignada a cada uno (Figura 132). El paciente de la cepa ICHGUV1000 es español y el de la cepa ICHGUV1012 es portugués. Ambas cepas se asignaron al linaje 4.10 (tipado de SNP) y no se detectaron resistencias.

La cepa ICHGUV1012 se aisló de una biopsia de ganglio obtenida el 13/05/15 del paciente A y la cepa ICHGUV1000 se obtuvo de un esputo del 18/05/2015 del paciente B (BAAR negativo). Según el facultativo responsable del paciente B, este paciente no tenía criterios clínicos de infección tuberculosa y lo consideró como una contaminación intra-laboratorio. Este paciente tuvo una muestra de esputo de dos días antes negativa para TB, si bien, la muestra fue de peor calidad. Del paciente A también se obtuvo un aspirado bronquial del 18/05/2015 (BAAR positivo) sembrado en la misma tanda que la muestra de la cepa ICHGUV1000 del paciente B. Lo cual podría apoyar esta hipótesis. Este caso se volverá a tratar más adelante desde el punto de vista de la WGS.



Figura 132. Disposición geográfica de los casos de tuberculosis del CC 17 en función del área de atención primaria de cada caso.

Prefijos: G = ICHGUV. Fuente del mapa: Google Maps. Modificado mediante el programa Inkscape.

Complejo clonal 18

El CC 18 lo comprenden dos cepas con idéntico mirutipo (Figura 117, Tabla 32), procedentes del mismo paciente, originario de Ghana. Ambas cepas proceden de esputos con 52 días de diferencia. En los dos casos los esputos se recogieron en periodo de tratamiento (17 y 69 días desde el inicio del tratamiento). Las cepas pertenecen al linaje 4.4 (por tipado de SNP) y no se detectaron resistencias.

Complejo clonal 19

Está formado por cuatro cepas con el mismo patrón MIRU (Figura 117, Tabla 32), pertenecientes a dos pacientes distintos (A y B), pero relacionados

epidemiológicamente. Del paciente A se obtuvo la cepa CHGUV331 a partir de una muestra de LCR del 01/04/2011 (BAAR positivo) y la cepa CHGUV332 de una muestra de jugo gástrico del 02/04/2011 (BAAR positivo). Mientras que del paciente B se obtuvo una cepa de una muestra de esputo inducido (05/04/2011, BAAR negativo) identificada con dos denominaciones distintas: CHGUV336 y ICHGUV526 (segundo control interno). El paciente B de origen rumano es el padre del paciente A, un niño menor de un año nacido en España (familiares convivientes). Las cepas se clasificaron mediante tipado de SNP como linaje 4.1.2 y no se detectaron resistencias.

Complejo clonal 20

Este CC está constituido por dos cepas con idéntico mirutipo (Figura 117, Tabla 32), pertenecientes a dos pacientes distintos, sin ninguna relación epidemiológica evidente. Las cepas se obtuvieron de sendos esputos con baciloscopia positiva, el primero en marzo de 2009 (CHGUV029) y el segundo en agosto de ese mismo año (CHGUV093). Los dos pacientes de origen español coincidían en el área de atención primaria asignada: el centro de salud de Aldaya. El tipado de SNP clasificó a las cepas dentro del linaje 4.2. La cepa CHGUV029, aislada en primer lugar, presentó resistencia fenotípica a INH, no detectada mediante GenoType MTBDR*plus* v.2.0. En cambio, en la cepa CHGUV093 no se detectó dicha resistencia fenotípica.

Complejo clonal 21

Está integrado por dos cepas con dos *loci* de diferencia entre ellas (Figura 117, Tabla 32), obtenidas de pacientes distintos, sin ninguna relación epidemiológica evidente. La cepa CHGUV048 se obtuvo de una muestra de esputo de mayo del 2009 y la cepa CHGUV111 de otro esputo de septiembre del mismo año. En el primer caso el paciente era bacilífero, no así el segundo.

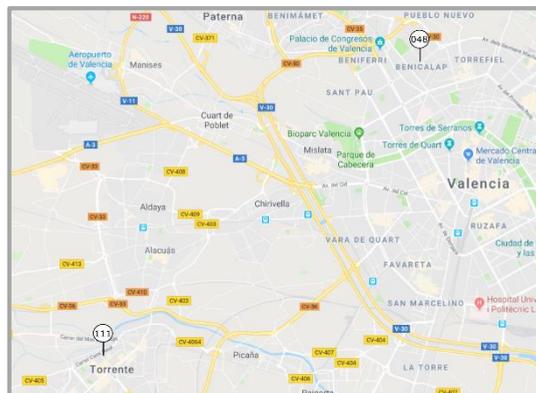


Figura 133. Disposición geográfica de los casos de tuberculosis del CC 21 en función del área de atención primaria de cada caso.

Prefijos = CHGUV. Fuente del mapa: Google Maps. Modificado mediante el programa Inkscape.

Resultados y Discusión

Ambos casos originarios de España se distribuyen en un radio de 6,4 km, según el área de atención primaria asignada a cada uno (Figura 133). Las cepas se clasificaron como linaje 4.3 mediante tipado de SNP. La primera cepa aislada presentó resistencia a INH, tanto fenotípica como genotípica (mutación C-15T en el gen *inhA* detectada mediante GenoType MTBDRplus v.2.0). Mientras que la segunda cepa (CHGUV111) fue sensible fenotípica y genotípicamente (GenoType MTBDRplus v.2.0).

Complejo clonal 22

El último CC detectado, está formado por cuatro cepas distanciadas entre sí por dos *loci* de diferencia (Figura 117, Tabla 32). Aisladas de cuatro pacientes distintos sin una relación epidemiológica evidente. Dos de las cepas se obtuvieron en 2009 (CHGUV067 y CHGUV140) y las otras dos una en 2014 (ICHGUV246) y otra 2015 (ICHGUVG1452). Se estudió la localización geográfica de los pacientes según el área de atención primaria asignada, la cual se muestra en la Figura 134. Los casos se distribuyen en un radio de 6,3 km. Todos los pacientes eran autóctonos y el 75% de las cepas se asignaron al linaje 4.10, excepto la cepa ICHGUVG1452 que se clasificó como linaje 4.3 (tipado de SNP). Lo que permite rechazar que esta cepa se agrupe con el resto, según el genotipado MIRU 24 con una diferencia de dos *loci*. Este error en la agrupación podría deberse a la homoplasia generada por esta técnica (40,42) o a un umbral demasiado laxo. Todas las cepas fueron sensibles a los antituberculosos de primera línea.



Figura 134. Disposición geográfica de los casos de tuberculosis del CC 22 en función del área de atención primaria de cada caso.

Prefijos: sin prefijo = CHGUV; G = ICHGUV. Fuente del mapa: Google Maps. Modificado mediante el programa Inkscape.

De los 22 CC descritos, en 9 de ellos se identificó una relación epidemiológica fiable. Aquí se tuvo en cuenta las cepas de un mismo paciente identificadas correctamente y los CC 2 y 15 con una relación epidemiológica parcial dentro de la agrupación (establecida solo entre alguno de los miembros

que forman parte del CC). Lo que supone un 40,91% de concordancia de la técnica con los datos epidemiológicos básicos. Quizás, si la comparación se hubiese realizado empleando datos de encuestas epidemiológicas llevadas a cabo desde Salud Pública, este dato podría haberse mejorado.

Por otro lado, para estimar el número de cadenas de transmisión se excluyeron los CC formados por dos cepas del mismo paciente (como el CC 10, 11 y 18). Empleando el umbral de como máximo dos *loci* de diferencia se detectaron 19 posibles cadenas de transmisión. Mientras que, si se reduce el umbral a un *locus* como máximo las cadenas de transmisión disminuyen a 17; el mismo número que si se considera exclusivamente tener idéntico mirutipo.

4.7.2.3 *Estadística de los casos agrupados y únicos*

Para realizar la estadística de los casos agrupados respecto a los no agrupados o únicos, se excluyeron los casos de cepas pertenecientes a un mismo paciente. Además, se consideraron como patrones únicos a los CC formados por dos cepas de un mismo paciente, siempre que no existiesen más cepas relacionadas con éstas (como el CC 10, 11 y 18). Las características demográficas y clínicas de los casos en función de si estaban agrupados o no según el genotipado MIRU-VNTR 24 *loci* con una diferencia máxima de 2 *loci* se muestra en la Tabla 33.

En la muestra estudiada las variables demográficas edad y género no presentaron diferencias estadísticamente significativas en función del agrupamiento. Sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,001$) en el origen de los pacientes, dónde se observó un predominio de los pacientes de origen español entre los casos agrupados, con una relación de 4:1. En cuanto a las variables clínicas, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,027$) en el diagnóstico de TB, observando más casos agrupados en pacientes con TB pulmonar. Lo cual era esperable dado que la transmisión de la TB es por vía aérea. Cabe comentar, que los cinco casos de TB extrapulmonar agrupados fueron tres TB ganglionares, una TB meníngea y una TB osteoarticular. Con los datos obtenidos retrospectivamente no se pudo comprobar si también existió o había existido TB pulmonar en dichos casos. El porcentaje de baciloscopias positivas entre ambos grupos de casos fue semejante, en torno al 60%, no hallándose diferencias estadísticamente significativas. Esto puede deberse a que el momento de la transmisión de la enfermedad y el momento de la recogida de la muestra se produjese en momentos distintos. La coinfección por el VIH fue ligeramente superior al 20% en los casos agrupados e inferior al 15% en los casos únicos, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas. El antecedente de tratamiento previo en los casos agrupados estuvo próximo al 15%, siendo la mitad de éste el porcentaje de tratamientos previos en los casos no relacionados con transmisión. Tampoco se hallaron diferencias estadísticamente significativas.

Resultados y Discusión

Tabla 33. Estadística de los casos agrupados y únicos. Genotipado por MIRU-VNTR 24 loci con una diferencia máxima de 2 loci.

No se han tenido en cuenta los casos duplicados (8 pacientes duplicados, n = 147) y las cepas de un mismo paciente se han considerado como únicas. El grado de asociación y la significación estadística (p valor) se calculó con un índice de confianza del 95% empleando las pruebas estadísticas adecuadas (véase la Tabla 23).

Características	Agrupados n (%) N = 67	Únicos n (%) N = 80	Grado de asociación p valor	χ^2 p valor
Edad			0,042	0,696
<15	3 (4,48)	2 (2,56)		
15 – 29	8 (11,94)	15 (19,23)		
30 – 44	28 (41,79)	32 (41,03)		
45 – 59	13 (19,40)	11 (14,10)		
≥ 60	15 (22,39)	18 (23,08)		
Género			0,055	0,506
Mujer	25 (37,31)	25 (32,05)		
Hombre	42 (62,69)	53 (67,95)		
País de origen			0,289	0,001*
España	55 (83,33)	43 (56,58)		
Otro origen	11 (16,67)	33 (43,42)		
Diagnóstico (sitio de la infección)			0,223	0,027*
Pulmonar	59 (88,06)	55 (69,62)		
Extrapulmonar	5 (7,46)	16 (20,25)		
Miliar	3 (4,48)	8 (10,13)		
Bacilíferos	40 (65,57)	36 (57,14)	0,087	0,400
Coinfección por el VIH	12 (21,43)	9 (14,52)	0,090	0,327
Situación evolutiva			0,105	0,253
Casos nuevos	47 (85,45)	58 (92,06)		
Casos tratados previamente	8 (14,55)	5 (7,94)		
Otras				
Alcoholismo	8 (14,04)	15 (25,00)	0,138	0,136
Diabetes	7 (11,67)	10 (16,13)	0,064	0,477
Neoplasia	7 (11,67)	7 (11,48)	0,003	0,974
UDVP	3 (5,26)	5 (8,20)	0,058	0,526
Linajes			0,461	0,000*
L4.1.2	36 (53,73)	14 (17,72)		
L4.3	17 (25,37)	22 (27,85)		
L4.10	12 (17,91)	17 (21,52)		
Otros	2 (2,99)	26 (32,91)		

*Diferencias estadísticamente significativas.

Al focalizar la atención en el microorganismo, sí se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) entre los linajes estudiados y la agrupación de los casos. Concretamente, el linaje 4.1.2 predominó entre los casos agrupados. Mientras que, el grupo “otros linajes” lo hizo entre los casos aislados. Dentro de “otros linajes” se incluyó al linaje 4.4 (35,71% dentro de este grupo), el cual se asoció por completo a casos aislados. El linaje 4.1.2 es un linaje generalista (41) y el más predominante en nuestro estudio (véase más adelante en el apartado 4.8.4). Esta circunstancia unida a que determinados linajes están mejor adaptados a determinadas poblaciones humanas y que, por

tanto, se transmiten mejor entre ellas (3), podría favorecer a que la mayoría de los CC hallados lo constituyan cepas del linaje 4.1.2.

No hubo diferencias estadísticamente significativas en las variables alcoholismo, diabetes, neoplasia y usuarios de drogas por vía parenteral (UDVP).

Si la Tabla 33 se realiza empleando el umbral de como máximo un *locus* de diferencia, las variables estadísticamente significativas se reducen al país de origen ($p = 0,010$) y a los linajes ($p < 0,001$) [Tabla no mostrada]. Y si se considera únicamente CC las cepas con el mismo mirutipo, sólo es estadísticamente significativa la diferencia de linajes ($p = 0,003$) [Tabla no mostrada].

4.7.2.4 Variabilidad del genotipado en función del tiempo

De los ocho pacientes con cepas duplicadas, en seis de ellos las cepas se obtuvieron en momentos diferentes. Estos datos se incluyen en la Figura 135, donde se representa la variabilidad de las cepas de un mismo paciente en función del tiempo en que se recogieron las muestras a partir de las cuales se aislaron dichas cepas. En cinco de los pacientes no hubo diferencias entre sus cepas empleando el genotipado MIRU-VNTR 24 *loci*, con diferencias de tiempo que oscilaron entre 1 y 52 días. Sí existieron diferencias con las cepas del paciente F, con una diferencia temporal de 5 años y 2 meses, existiendo entre ellas una diferencia de un *locus*.

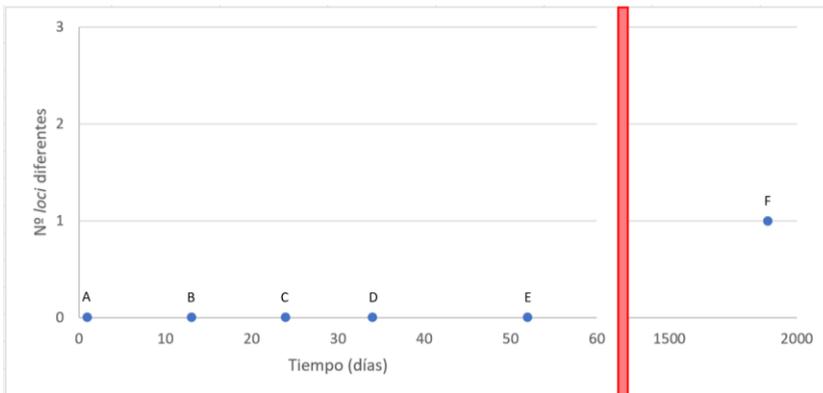


Figura 135. Diferencias entre las cepas de un mismo paciente en función del tiempo. Genotipado mediante MIRU-VNTR 24 *loci*.

Otro aspecto a destacar son las cepas de un mismo paciente obtenidas de localizaciones distintas. Aquí se incluye al paciente A de la Figura 135 (CC 19), con cepas obtenidas de jugo gástrico y de líquido cefalorraquídeo (con un día de diferencia) sin que se encontraran diferencias en el mirutipo. Tampoco se hallaron diferencias en el paciente C (esputo y BAS, CC 10) ni en el paciente D (exudado de úlcera y biopsia PAAF, CC 11).

Resultados y Discusión

4.7.2.5 *Discrepancia en la sensibilidad a fármacos en un mismo CC*

En cinco CC (2, 8, 12, 20 y 21) se hallaron discrepancias en el patrón de resistencia de cepas asignadas a un mismo CC, mediante MIRU-VNTR 24 *loci* (Tabla 34).

Tabla 34. Discrepancias observadas en la resistencia a los antituberculosos de primera línea entre cepas asignadas a un mismo CC, mediante MIRU-VNTR 24 *loci*.

CC	<i>Loci</i> de diferencia	Resistencia
#2b	0	INH y RMP
#8	1	RMP
#12	2	INH y SM
#20	0	INH
#21	2	INH

Una posible explicación para esta discrepancia podría ser la homoplasia generada por la técnica empleada para la genotipificación (40,42). Otra posible explicación sería que las cepas englobadas dentro de un mismo CC se hayan expuesto a concentraciones subóptimas de fármaco en alguno de los pacientes, favoreciendo la selección de determinadas subpoblaciones. De hecho, en el genotipado mediante WGS los análisis bioinformáticos empleados para detectar si dos cepas están genéticamente relacionadas, dejan fuera las regiones determinantes de resistencia conocidas. De este modo se evitan sesgos debidos a la presión selectiva que ejerce el uso de fármacos sobre las cepas.

4.7.3 *Tipificación mediante MIRU-VNTR 15 loci*

La tipificación mediante MIRU-VNTR de 15 *loci* se obtuvo mediante la plataforma *on-line* MIRU-VNTR*plus* a partir de los datos de los 24 *loci* previamente introducidos.

4.7.3.1 *Determinación de patrones agrupados y únicos*

Para determinar la presencia de patrones agrupados y únicos dentro de las 155 cepas tipificadas mediante MIRU-VNTR de 15 *loci*, se realizó un árbol de mínima expansión (MST) a través de la plataforma MIRU-VNTR*plus* (Figura 136). Para facilitar la posterior comparación con los 24 *loci*, los complejos clonales mantienen la misma denominación que la tipificación con MIRU 24 *loci*.

Teniendo en cuenta los agrupamientos con una diferencia máxima entre cepas de dos *loci*, el número de CC detectados fue de 17. Dichos CC engloban al 55,48% de los aislados clínicos estudiados (n = 86). Mientras que el 44,52% restante fueron patrones únicos (n = 69). La distribución de las cepas entre los distintos CC se representa en la Tabla 35 (basada en la Figura 136). Los CC presentan un mínimo de 2 cepas y un máximo de 30.

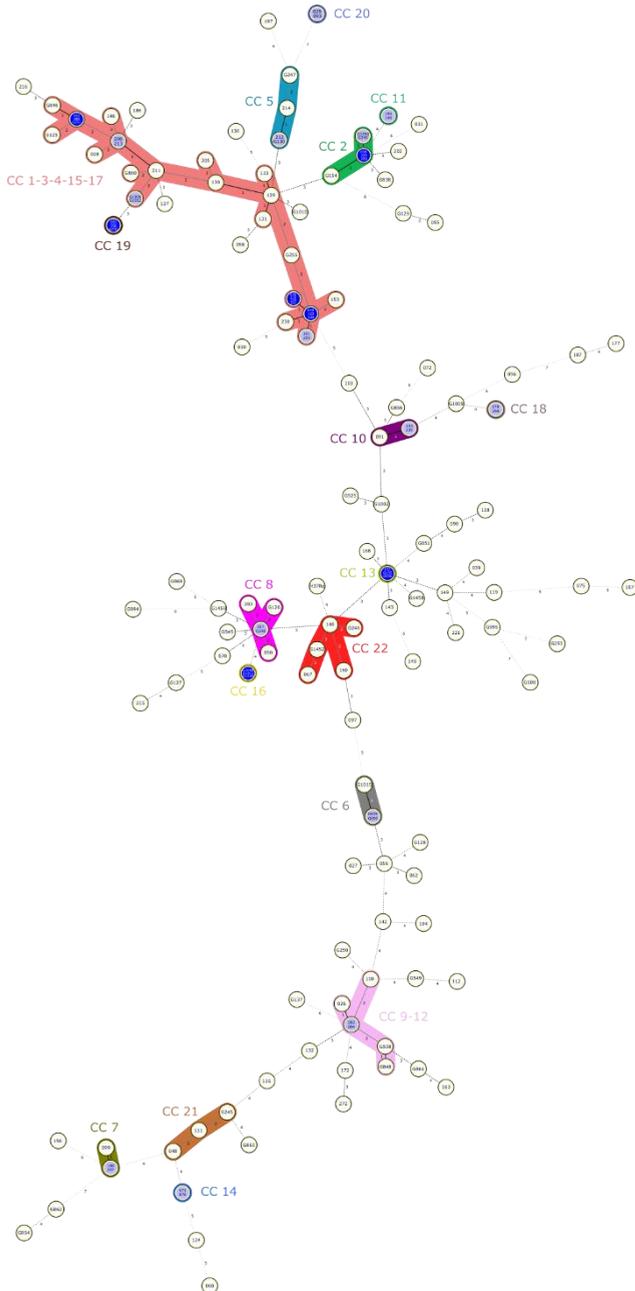


Figura 136. Árbol de mínima expansión construido a partir de los aislados estudiados mediante MIRU-VNTR 15 *loci*, con una diferencia máxima entre complejos clonales (CC) de 2 *loci*. Obtenida de la plataforma *on-line* MIRU-VNTR_{plus} y adaptada posteriormente mediante el programa Inkscape.

Resultados y Discusión

Tabla 35. Complejos clonales detectados mediante MIRU-VNTR de 15 loci y comparación respecto a 24 loci, empleando una diferencia máxima de 2 loci ($\neq 2$).

Leyenda: “;” separa cepas con distinto mirutipo; “-” separa cepas con idéntico mirutipo; tipología negrita con sombreado amarillo – idéntico mirutipo; tipología normal con sombreado amarillo - diferencia máxima de 1 locus; tipología normal - diferencia máxima de 2 loci; color rojo – diferencias respecto a 24 loci. Abreviaturas: CC – Complejo clonal; ID – Identificación.

CC MIRU 15	n ($\neq 2$)	ID Cepas	CC MIRU 24
#1-3-4-15-17	30	036-210-229-231; 191-205; 123-228-049; 230; 153; G255	#1
		033-G251-088; G846; G125	#3
		129; 130; 131; 133	#4
		206-213; 211; 305	#15
		G1000-G1012	#17
		28; 146; G860	Únicos
#2	6	038-269-280; G1590-G249; 154	#2
#5	4	212-G130; 214	#5
		G247	Único
#6	3	G839-G850; G1015	#6
#7	3	188-207; 099	#7
#8	5	217-G548; 050; 203	#8
		G126	Único
#9-12	6	G538; G848	#9
		082-084; 026; 100	#12
#10	3	233-236	#10
		91	Único
#11	2	190-196	#11
#13	3	152-G135-G536	#13
#14	2	071-078	#14
#16	3	G1008-G1011-G1449	#16
#18	2	278-298	#18
#19	4	331-332-336-G256	#19
#20	2	029-093	#20
#21	3	048; 111	#21
		G245	Único
#22	5	067; 140; G246; G1452	#22
		160	Único
Total	86		

4.7.4 Comparación de MIRU-VNTR 15 loci respecto 24 loci

La Tabla 35 del apartado anterior, también compara la detección de CC mediante MIRU-VNTR de 15 *loci* respecto a los 24 *loci*. Con los 15 *loci* el número de agrupamientos detectados disminuye a costa de incrementar el número de cepas en algunos de ellos.

También se estudió la influencia del umbral establecido en el tipado MIRU-VNTR de 15 *loci*, reflejado en la Figura 137. En ella se observa como a medida que se reducen las diferencias permitidas entre cepas, se reduce el número de cepas agrupadas, como también ocurre con la tipificación mediante MIRU-24. Por otro lado, la técnica MIRU-15 detecta un mayor número de cepas agrupadas en comparación con MIRU-24, para cada uno de los umbrales establecidos.

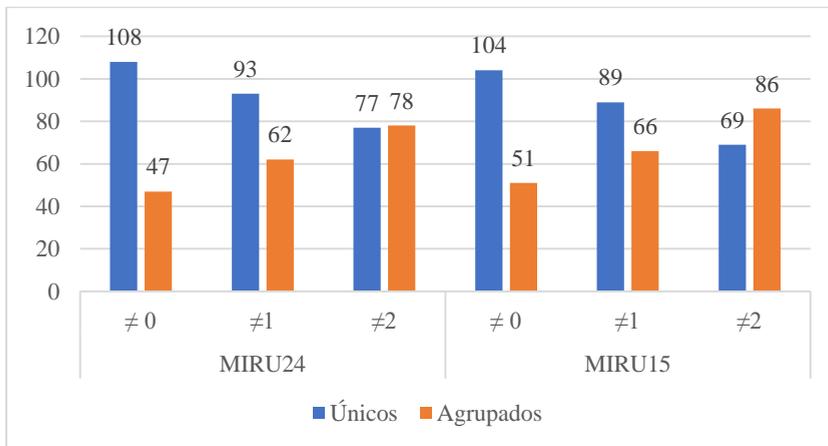


Figura 137. Diagrama de barras con las frecuencias absolutas de las cepas agrupadas o no en función del umbral establecido a la hora de asignar los complejos clonales: idéntico mirutipo ($\neq 0$), diferencia máxima de 1 *locus* ($\neq 1$) o diferencia máxima de 2 *loci* ($\neq 2$). Tipificación mediante MIRU-VNTR 24 *loci* y 15 *loci*.

Para determinar el poder discriminatorio de las dos técnicas en función del umbral establecido, se calculó el índice discriminatorio de Hunter-Gaston (HGDI) (185). Los resultados se muestran en la Figura 138. El mejor poder discriminatorio lo obtuvo la técnica MIRU-24 *loci* considerando CC solo aquellas cepas con el mismo mirutipo, seguida de cerca por la técnica MIRU-15 empleando el mismo punto de corte. La menos discriminatoria fue la técnica MIRU-15 con el umbral de como máximo dos *loci* de diferencia. En todos los casos se obtuvieron valores por encima de 0,9000.

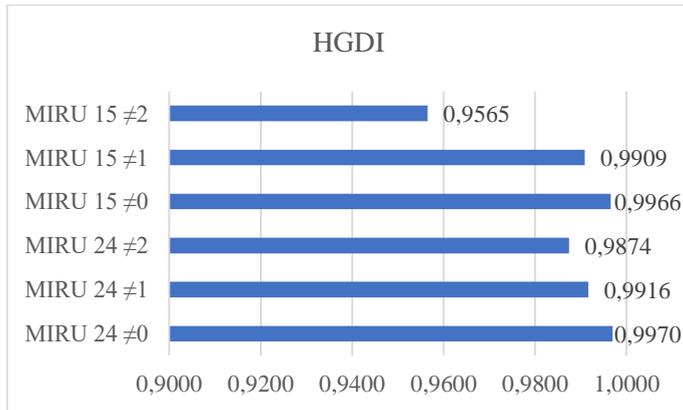


Figura 138. Comparación del índice discriminatorio de Hunter-Gaston (HGDI) obtenido para cada una de las dos técnicas empleadas, teniendo en cuenta el umbral establecido a la hora de asignar los complejos clonales: idéntico mirutipo ($\neq 0$), diferencia máxima de 1 locus ($\neq 1$) o diferencia máxima de 2 loci ($\neq 2$).

4.8 Clasificación en linajes y sub-linajes

La clasificación en linajes y sub-linajes se realizó a partir de los datos obtenidos mediante MIRU-VNTR 24 loci y mediante tipado de SNP, ya sea mediante HRM o *in silico* tras secuenciación. En los siguientes apartados se muestran los resultados obtenidos, así como una comparativa de las distintas metodologías.

4.8.1 Asignación de linajes mediante MIRU-VNTR de 24 loci

La asignación de linajes y sub-linajes mediante MIRU-VNTR 24 loci se realizó usando la plataforma MIRU-VNTRplus. Primero mediante búsqueda por similitud (*similarity search*) y en los casos no concluyentes, se realizó *a posteriori* por el método de identificación basada en árbol filogenético (*tree-based identification*), ya sea por el método *Neighbor joining* (NJ) o UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) (178,179). En la Figura 139 se muestra la asignación de linajes a las 155 cepas mediante el método NJ. Los resultados están recogidos en el Apéndice XI: Asignación de linajes en función de la metodología empleada. Cabe indicar que el sub-linaje H37Rv asignado por la plataforma MIRU-VNTRplus hace referencia al linaje L4.10 (también denominado PGG3).

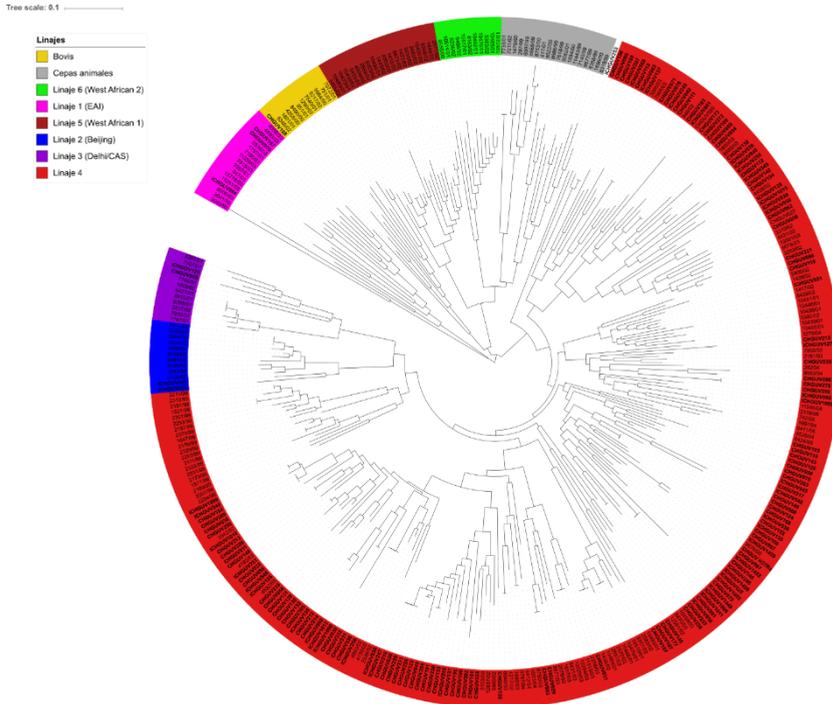


Figura 139. Asignación de linajes mediante MIRU-VNTR 24 loci. Árbol filogenético radial obtenido mediante el método *Neighbor Joining* a partir de la plataforma MIRU-VNTR $plus$ y modificado mediante la plataforma iTOL (184).

Las cepas con tipología **negrita** corresponden a las 155 cepas estudiadas. El resto de las cepas pertenecen a la base de datos de MIRU-VNTR $plus$, empleadas para la asignación de linajes.

De las 155 cepas estudiadas solo una cepa (0,65%) no llegó a asignarse a ningún linaje concreto (cepa ICHGUV253), según la base de datos de la plataforma MIRU-VNTR $plus$. No hubo discrepancias entre las dos metodologías (NJ o UPGMA) a la hora de asignar los linajes principales.

La Figura 140 recoge todas las cepas estudiadas junto a las cepas presentes en la base de datos MIRU-VNTR $plus$, empleadas para la asignación de linajes; mientras que, la Figura 141 solo presenta las 155 cepas objeto de estudio. Ambas figuras permiten valorar la asignación de los linajes principales en comparación con los artículos de Comas *et al.* y Brites *et al.* (2,3,40). Figura 27 y Figura 28, respectivamente.

Resultados y Discusión

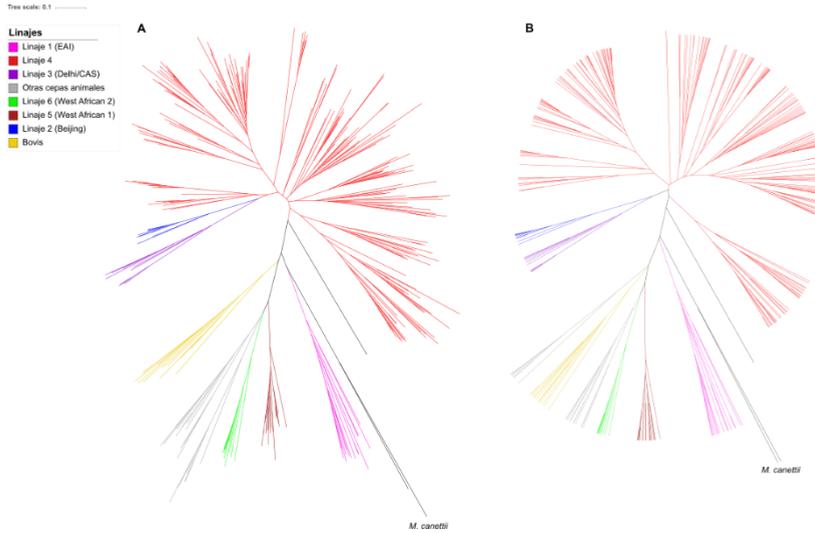


Figura 140. Asignación de linajes mediante MIRU-VNTR 24 *loci*. Árboles filogenéticos obtenidos mediante el método *Neighbor Joining* (A) y UPGMA (B) a partir de la plataforma MIRU-VNTR*plus* y modificado mediante la plataforma iTOL (184). Ambos árboles presentan las 155 cepas estudiadas y la colección de cepas de la base de datos de MIRU-VNTR*plus*, empleadas para la asignación de linajes de nuestras cepas. Enraizados en dos cepas de *M. canettii*.

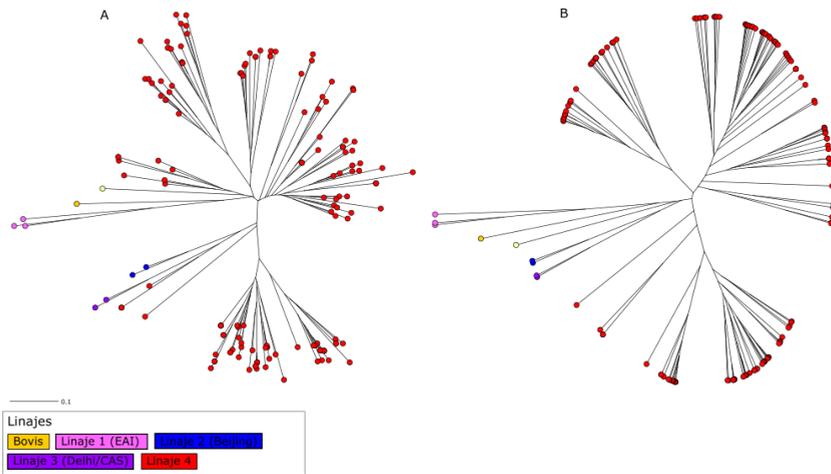


Figura 141. Asignación de linajes mediante MIRU-VNTR 24 *loci*. Árboles filogenéticos obtenidos mediante el método *Neighbor Joining* (A) y UPGMA (B) a partir de la plataforma MIRU-VNTR*plus* con las 155 cepas estudiadas. El punto coloreado en amarillo claro hace referencia a la cepa ICHGUV253 no asignada a ningún linaje. Enraizados en las cepas del linaje 1.

En primer lugar, la diferenciación entre el clado denominado “antiguo” sin la delección TbD1 (TbD1+) y el “moderno” con dicha delección (TbD1-) es

acertada. Con la salvedad de la metodología UPGMA cuando se representan solo las 155 cepas estudiadas (Figura 141 B). Probablemente debido al reducido número de cepas estudiadas de los linajes 2 y 3.

El clado antiguo engloba a *M. canettii* (forma parte de los llamados “bacilos tuberculosos lisos” (STB), la bacteria más probable para compartir el ancestro común más reciente con el MTBC), *M. africanum* (linaje 5 o también denominado *West African 1* y linaje 6 o *West African 2*), *M. bovis* y otras cepas animales, así como *M. tuberculosis* en sentido estricto del linaje 1 (*Indo-Oceanic* o EAI) y del linaje 7 (linaje etíope¹⁴) (2,3,40). Lo que se ve perfectamente en la Figura 140, no así en la Figura 141 por el motivo comentado en el párrafo anterior. La clasificación filogenética mediante MIRU-VNTR 24 *loci* dentro de este clado es buena. No obstante, *M. bovis* está asignado incorrectamente (Figura 140 A y B). Es incorrecto porque se sabe que *M. bovis* presenta las mismas deleciones (RD7, RD8, RD9 y RD10) que el linaje 6 y otras cepas animales, mientras que el linaje 5 solo presenta la deleción en RD9 (3). Lo cual indica que *M. bovis* evolucionó de un ancestro común con el linaje 5 y no a la inversa; diferenciándose de éste junto con el linaje 6 y el resto de las cepas animales (Figura 28). Esto supone que las cepas de animales derivan de un ancestro común compartido con *M. africanum* linaje 6, que actualmente se considera un linaje adaptado al ser humano (3).

En el análisis de los datos mediante UPGMA (Figura 140 B), también identifican de forma incorrecta la relación filogenética de algunas de las cepas animales, concretamente *M. pinnipedii* y *M. microti*, del mismo modo que *M. bovis*.

Mediante la filogenia con MIRU tampoco se ve claro que el ancestro común de los linajes 5 y 6 (*M. africanum*) y los linajes adaptados a los animales se separaran antes del ancestro común del MTBC que el ancestro del cual derivaron todos los linajes pertenecientes a *M. tuberculosis sensu stricto*. Siendo el linaje 1 el más antiguo dentro de este grupo de cepas, seguido por el linaje 7 (no presente en la base de datos MIRU-VNTR_{plus}) (3).

Un evento posterior de divergencia originó el antecesor del clado “moderno” que consta de tres linajes separados, aunque relacionados: linaje 4 (también conocido como euroamericano), linaje 2 (oriental asiático, incluye la familia de cepas Beijing) y el linaje 3 (Delhi/CAS) (2,3,40). A grandes rasgos la asignación de estos linajes mediante MIRU-VNTR 24 *loci* es adecuada, sobre todo, con la metodología *Neighbour Joining* (Figura 140 A). No obstante, existen diferencias filogenéticas al compararlos con los artículos indicados anteriormente (2,3,40). Concretamente con la metodología UPGMA (Figura 140 B), pues no termina de agrupar de forma concisa todas las cepas del linaje 4.

¹⁴ No se dispone de ninguna cepa de linaje 7 ni entre las cepas estudiadas ni en la base de datos de la plataforma MIRU-VNTR_{plus}.

Resultados y Discusión

En segundo lugar, dentro de los distintos linajes principales existen subgrupos, denominados “sub-linajes”. Puesto que la mayoría de las cepas estudiadas pertenecen al linaje 4, nos centraremos en la discriminación de los sub-linajes de este grupo mediante genotipificación por MIRU-VNTR 24 *loci*. Los resultados se muestran en el Apéndice XI: Asignación de linajes en función de la metodología empleada. La Figura 142 y Figura 143 representan la asignación de sub-linajes dentro del linaje 4 por el método *Neighbor Joining* y UPGMA, respectivamente. Las discrepancias encontradas en función de la metodología empleada en la identificación mediante árbol filogenético fueron cinco, las cuales se muestran en la Tabla 36.

Tabla 36. Discrepancias en la asignación de linajes mediante NJ y UPGMA. Genotipado por MIRU-VNTR de 24 *loci*.

NJ	UPGMA	Frecuencia
H37Rv (L4.10 o PGG3)	LAM (L4.3)	2
H37Rv (L4.10 o PGG3)	-	1
NEW-1	Uganda I (L4.6.1)	1
S (L4.4)	H37Rv (L4.10 o PGG3)	1

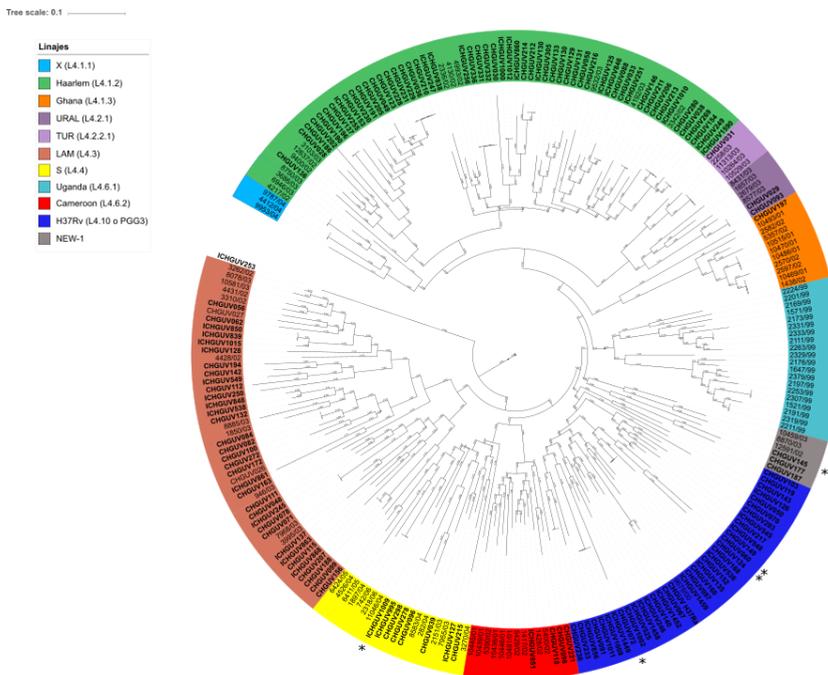


Figura 142. Asignación de sub-linajes dentro del linaje 4 mediante MIRU-VNTR 24 *loci*. Árbol filogenético radial obtenido mediante el método *Neighbor Joining* a partir de la plataforma MIRU-VNTRplus y modificado mediante la plataforma iTOL. Las cepas con tipología negrita corresponden a las cepas estudiadas. El resto de las cepas pertenecen a la base de datos de MIRU-VNTRplus, empleadas para la asignación del sub-linaje. Las cepas en las que existe discrepancia respecto al método UPGMA presentan un asterisco (*).

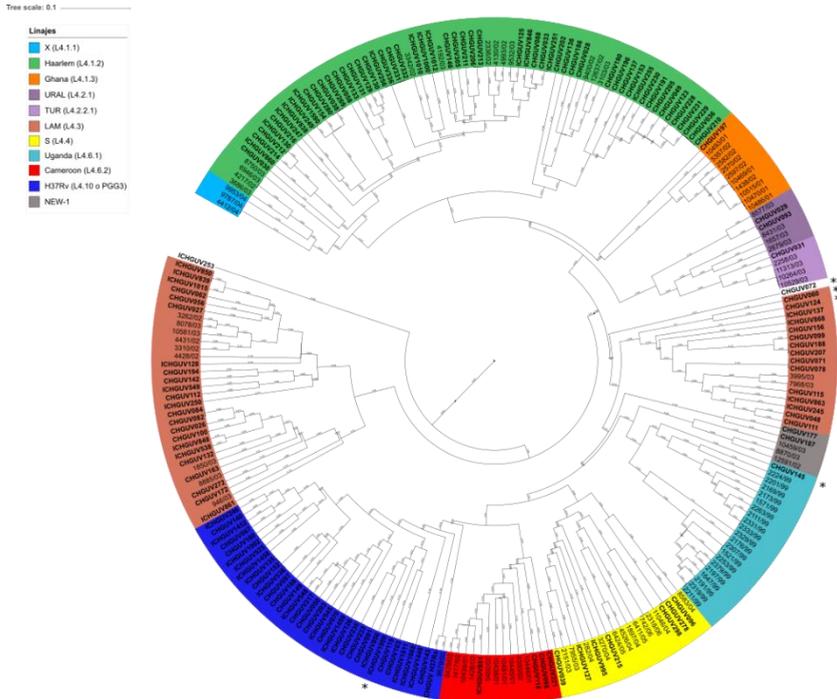


Figura 143. Asignación de sub-linajes dentro del linaje 4 mediante MIRU-VNTR 24 *loci*. Árbol filogenético radial obtenido mediante el método UPGMA a partir de la plataforma MIRU-VNTR $plus$ y modificado mediante la plataforma iTOL. Las cepas con tipología negrita corresponden a las cepas estudiadas. El resto de las cepas pertenecen a la base de datos de MIRU-VNTR $plus$, empleadas para la asignación del sub-linaje. Las cepas en las que existe discrepancia respecto al método *Neighbor Joining* presentan un asterisco (*).

Si comparamos las relaciones filogenéticas establecidas mediante MIRU-VNTR 24 *loci* dentro del linaje 4, respecto a los artículos de Stucki *et al.* (41) (Figura 29) y Coll *et al.* (42) (Figura 144), se observa que no son acertadas. Probablemente consecuencia de la homoplasia generada con el empleo de la metodología MIRU-VNTR, descrita previamente en la literatura (40,42).

La evaluación de la asignación de linajes y sub-linajes mediante MIRU se realizará en el apartado 4.8.3.

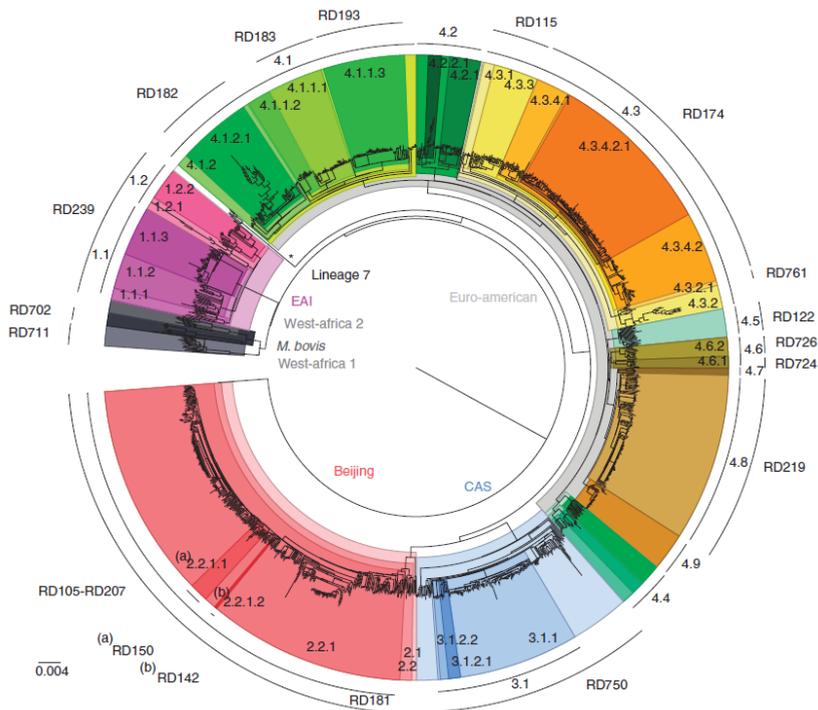


Figura 144. Filogenia global de 1.601 aislados de MTBC. Fuente: Coll *et al.* (42). Utilizaron un total de 91.648 SNP que abarcan todo el genoma para reconstruir la filogenia de dichos aislados. Los siete linajes principales de MTBC están indicados en el área interna del árbol. Los sub-linajes principales están anotados en el arco externo junto con los RD específicos del linaje. Los clados identificados están codificados por colores.

4.8.2 Asignación de linajes mediante tipado de SNP

La asignación de linajes y sub-linajes mediante el tipado de SNP se realizó en unas cepas por HRM (cepas con el prefijo “CHGUV”) y en otras mediante análisis *in silico* tras WGS (cepas con el prefijo “ICHGUV”, además de 4 cepas que también se secuenciaron *a posteriori*: CHGUV038, CHGUV269, CHGUV280, CHGUV154). Cabe indicar previamente, que los linajes L4.7, L4.8 y L4.9 (obtenidos *in silico*) están englobados dentro del L4.10. Los resultados obtenidos por ambas metodologías están recogidos en el Apéndice XI: Asignación de linajes en función de la metodología empleada.

Hubo dos cepas estudiadas mediante HRM asignadas al linaje 4 (CHGUV143 y CHGUV145), pero que no pudieron ser clasificadas en un sub-linaje concreto. Esto podría deberse a la existencia de otros sub-linajes que no han sido descritos hasta el momento, o bien, que no han sido clasificados como sub-linajes independientes dentro del L4.

4.8.3 *Evaluación de la asignación de linajes mediante MIRU-VNTR respecto al tipado de SNP*

En primer lugar, se evaluó la tipificación de linajes mediante MIRU-VNTR 24 *loci* respecto al tipado de SNP *in silico* tras secuenciación (n = 55 cepas). La asignación de linajes mediante WGS se ha visto previamente en la Figura 145. Mientras que, la clasificación mediante MIRU para esas mismas cepas se muestra en la Figura 146 con la metodología *Neighbor Joining* y en la Figura 147 mediante UPGMA. Previamente indicar, que entre ambas metodologías (NJ y UPGMA) se observó solo una diferencia a la hora de asignar los linajes. Mediante NJ la cepa ICHGUV1009 se asignó al linaje S (L4.4) y por UPGMA al linaje L4.10, pero este hecho solo se da cuando se analizan todas las cepas estudiadas (no reflejado en la Figura 147, sí en la Figura 143). Por otro lado, existen claras discrepancias en cuanto a las relaciones filogenéticas inferidas por ambas metodologías (NJ y UPGMA).

Respecto al tipado de SNP *in silico*, existen tres discrepancias (5,45%). La primera en la cepa ICHGUV1009, comentada en el párrafo anterior. Mediante WGS esta cepa pertenece al linaje L4.4.1 (tipo S) lo que concuerda con la predicción mediante NJ, pero no con UPGMA. La segunda cepa es la ICHGUV253, sin clasificar mediante MIRU y clasificada como L4.4.2 mediante WGS. La no clasificación por parte de la base de datos MIRU-VNTR_{plus} podría deberse a la falta de cepas de este linaje en la base de datos, o bien, a una mala clasificación debido a la homoplasia que presenta la técnica (40,42). La última cepa es la ICHGUV1452, clasificada como L4.10 por MIRU y como L4.3 mediante WGS.

En cuanto a las relaciones filogenéticas, NJ diferencia bien los linajes principales, así como el sub-linaje L4.1.2 del resto de sub-linajes L4. En cambio, mediante UPGMA esta diferencia no es tan aparente. Por otro lado, la relación filogenética inferida mediante NJ para el linaje L4.3 y L4.10 es buena, no así para el L4.4 y L4.6.2. Estos dos últimos están mejor clasificados mediante UPGMA.

En segundo lugar, se comparó la asignación de linajes MIRU-VNTR 24 *loci* respecto al tipado de SNP por HRM (n = 103). Los resultados se muestran en el Apéndice XI: Asignación de linajes en función de la metodología empleada. La asignación de linaje y sub-linaje fue correcta en 96 de las 103 cepas (93,20%). En dos casos se estableció el linaje 4 por HRM, pero no se pudo conocer el sub-linaje (explicación dada anteriormente). Y en cinco cepas hubo discrepancias respecto al genotipado por MIRU:

- Las cepas CHGUV060 y CHGUV124 se clasificaron como L4.3 mediante HRM, coincidiendo con la asignación mediante la metodología UPGMA, pero no con la NJ, que fue L4.10.
- Las cepas CHGUV177 y CHGUV187 se clasificaron como L4.4 mediante HRM, mientras que como NEW-1 por MIRU.

- La cepa CHGUV197 se clasificó como L4.1.1 (Tipo X) mediante HRM, y como Ghana (L4.1.3) por MIRU.

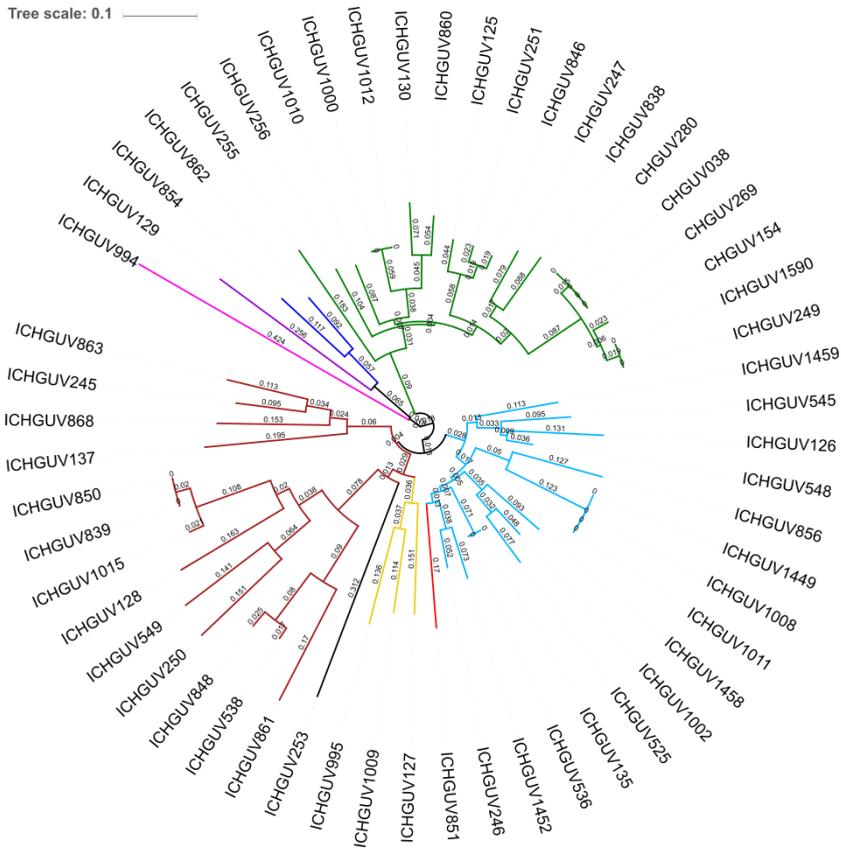


Figura 146. Árbol filogenético radial obtenido por el método *Neighbor Joining* a partir de los datos del genotipado mediante MIRU-VNTR 24 loci. Incluye las 55 cepas secuenciadas.

Leyenda: EAI (L1) – rosa; “Beijing” (L2) – azul oscuro; Delhi/CAS (L3) – morado; Haarlem (L4.1.2) – verde; LAM (L4.3) – marrón; S (L4.4) – amarillo; Cameroon (L4.6.2) – rojo; “H37Rv” (L4.10) – azul claro; Sin clasificar – negro.

En las cuatro cepas secuenciadas *a posteriori* se realizó la asignación de linajes tanto *in silico* como mediante HRM, siendo la misma por ambos métodos (cepas: CHGUV038, CHGUV269, CHGUV280 y CHGUV154).

Por otro lado, dentro del L4.3 y L4.4 se observan tres subgrupos que coinciden con las cepas tipificadas mediante WGS.

El tipado de SNP permitió resolver la mayoría de las discrepancias encontradas entre los dos métodos empleados para la asignación de linajes mediante MIRU, visto previamente en la Tabla 36. Las cepas CHGUV060 y CHGUV124 pertenecen al L4.3, coincidiendo con la predicción UPGMA. En cambio, en la cepa ICHGUV1009 la tipificación correcta fue la de NJ, clasificándola como L4.4. La cepa CHGUV145 se clasificó como L4, pero no se pudo identificar el sub-linaje; con lo cual, no se pudo resolver dicha discrepancia. La cepa ICHGUV253 se tipó como L4.4, no habiendo obtenido linaje mediante MIRU. Y la cepa CHGUV072 se clasificó adecuadamente como L4.10 mediante NJ, pero sin clasificar por UPGMA.

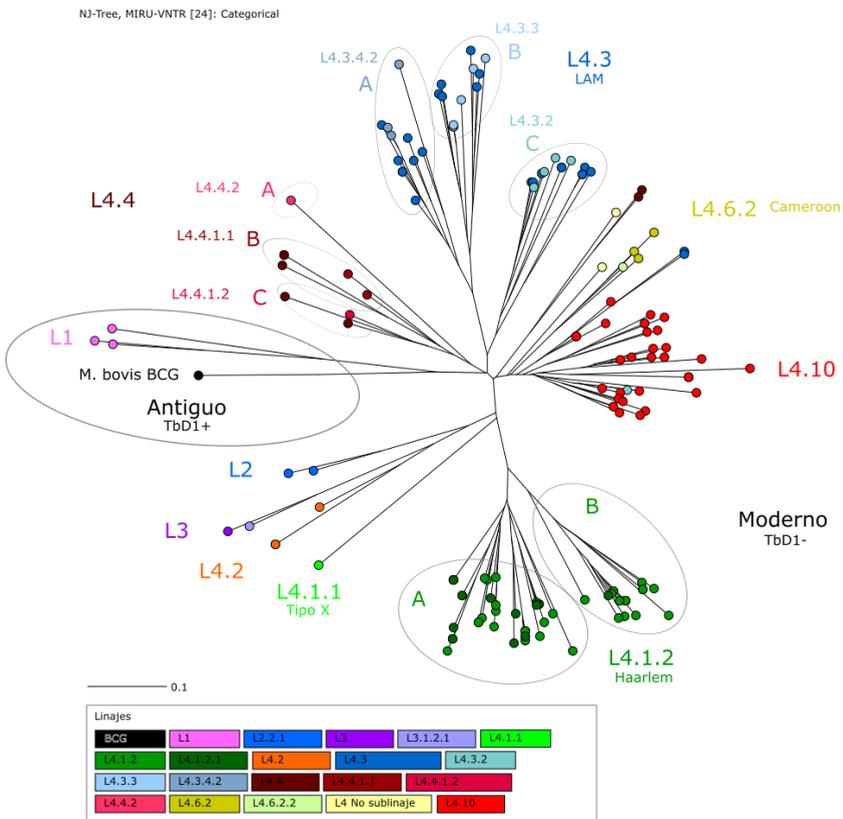


Figura 148. Árbol filogenético radial obtenido por el método *Neighbor Joining* a partir de los datos de genotipado mediante MIRU-VNTR 24 loci de las 154 cepas estudiadas. No incluye el control positivo. Los linajes y sub-linajes mostrados se han asignado mediante tipado de SNP, ya sea mediante HRM o por secuenciación.

Resultados y Discusión

Además, de las discrepancias dentro de la metodología empleada para el genotipado MIRU, también se observaron cinco diferencias más entre MIRU y el tipado de SNP. Expuestas a continuación:

- La cepa ICHGUV1452 se asignó al L4.3 mediante WGS y clasificada como L4.10 mediante MIRU.
- La cepa CHGUV143 fue clasificada como L4.10 mediante MIRU, pero solo se llegó hasta el linaje 4 mediante HRM (sin sub-linaje).
- Las cepas CHGUV177 y CHGUV187 se clasificaron como L4.4 mediante HRM, mientras que como NEW-1 por MIRU.
- La cepa CHGUV197 se clasificó como L4.1.1 (Tipo X) mediante HRM, y como Ghana (L4.1.3) por MIRU.

En definitiva, el porcentaje de acierto para la técnica MIRU-VNTR 24 *loci* a la hora de asignar linaje/sub-linaje fue del 94,81% para ambas metodologías (NJ y UPGMA).

4.8.4 Frecuencia de los linajes en las cepas estudiadas

La frecuencia de los linajes asignados mediante el tipado de SNP se muestra en la Tabla 37 y la Figura 149. El linaje predominante fue el 4 (Euroamericano) con un 94,81%. El 5,19% restante, lo conforman cepas pertenecientes al L1, L2, L3 y *M. bovis*. Dentro del linaje 4, el sub-linaje más frecuente fue el L4.1.2 (Haarlem) con un 35,71%, seguido del L4.3 (LAM) con un 25,32% y del L4.10 (PGG3) con un 20,13%.

Tabla 37. Frecuencia de los linajes en las cepas estudiadas asignados mediante tipado de SNP.

Linaje	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)
L1	3	1,95
L2	2	1,30
L3	2	1,30
L4.1.1	1	0,65
L4.1.2	55	35,71
L4.2	3	1,95
L4.3	39	25,32
L4.4	11	7,14
L4.6.2	4	2,60
L4.10	31	20,13
L4. Sin clasificar	2	1,30
<i>M. bovis</i>	1	0,65
Total	154	100,00

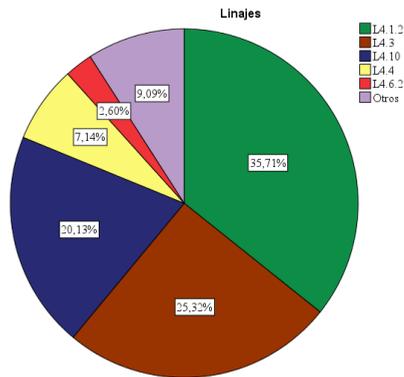


Figura 149. Frecuencia relativa de los linajes en las cepas estudiadas asignados mediante tipado de SNP.

4.8.5 Distribución de los linajes en relación con las variables demográficas edad y género

La intensidad de la asociación entre la edad de los casos y la variable linaje de las cepas fue alta (tamaño del efecto 6,508), pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,110$), lo cual se puede apreciar en el diagrama de cajas de la Figura 150.

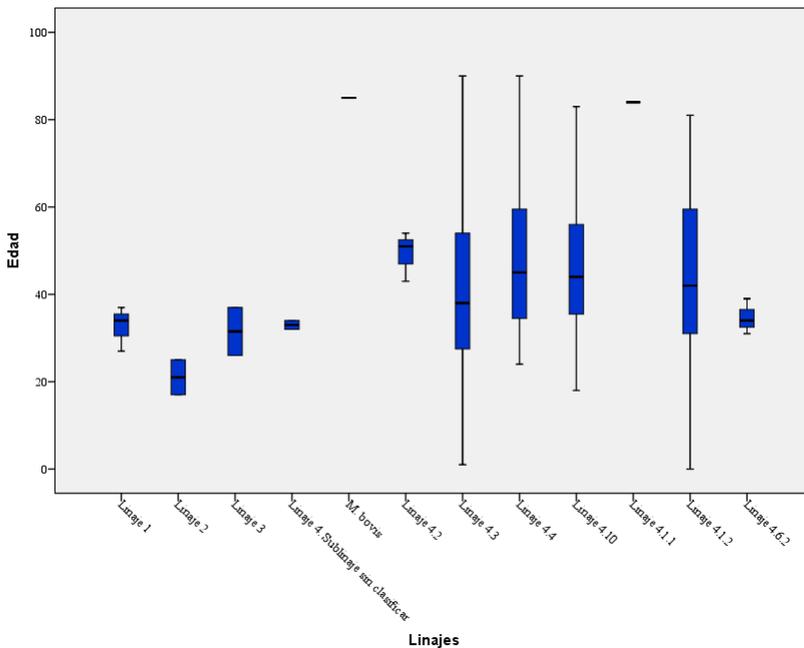


Figura 150. Distribución de los linajes en función de la edad de los casos.

Resultados y Discusión

En cuanto al género de los casos, su distribución en función del linaje de las cepas se representa en la Figura 151. El grado de dependencia entre ambas variables fue bajo (V de Cramer = 0,299), no pudiéndose calcular la significación estadística debido a la ausencia de casos en algunas de las casillas de la tabla de contingencia.

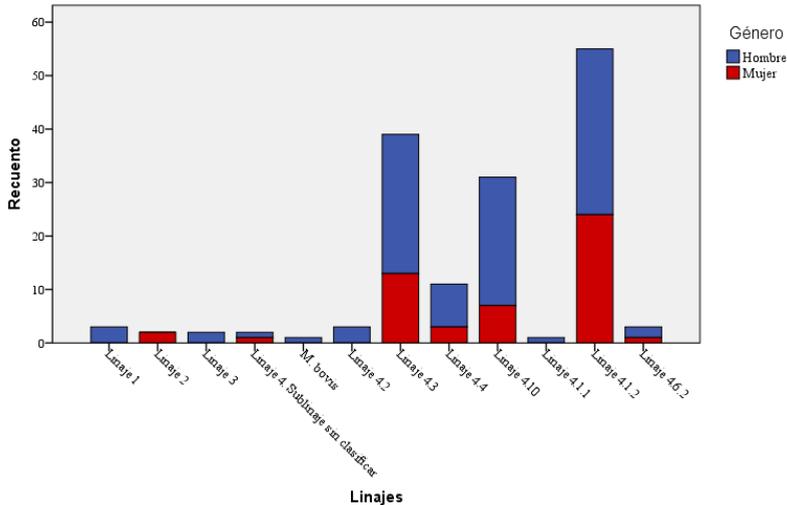


Figura 151. Distribución de los linajes en función del género de los casos.

En ambos casos las limitaciones referidas al tamaño muestral hacen que los resultados inferenciales deban ser tomados como específicos de esta muestra y no representativos de toda la población.

4.8.6 Distribución geográfica de los linajes estudiados

La distribución geográfica de los linajes (clasificados por tipado de SNP) en función del país de origen del paciente se muestra en la Figura 152. Las cepas clasificadas como linaje 1 pertenecían a pacientes procedentes de India, Pakistán y Venezuela. El origen de los dos primeros pacientes coincide con la distribución típica de este linaje (Indo-Oceánico) (64); no siendo así en el tercer paciente. Sin embargo, también se han descrito casos en la zona del caribe (49). Los pacientes infectados con cepas de linaje 2 fueron oriundos de España y Perú. Se sabe que el linaje 2, también denominado oriental asiático, se localizó inicialmente en Rusia, este de Europa, Sudáfrica y el este de Asia. No obstante, hoy en día está ampliamente distribuido a nivel mundial. Las cepas de linaje 3 pertenecían a un paciente de Pakistán y otro de Senegal. El primer origen si coincide con la distribución propia de este linaje: centro de Asia, subcontinente indio y el este de África; pero no el segundo.

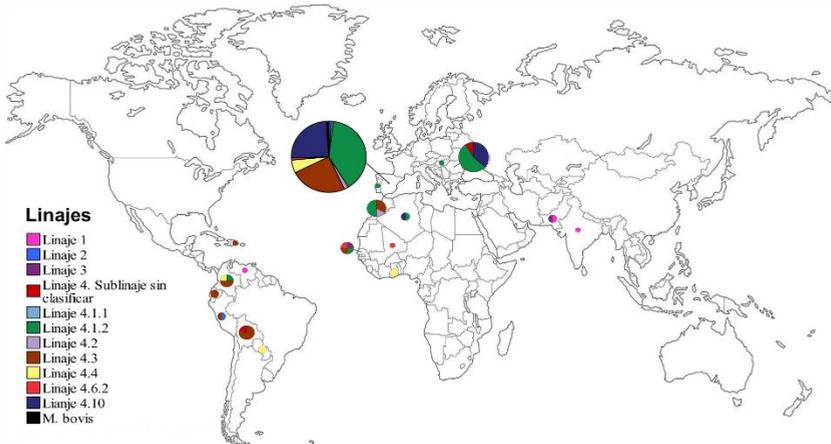


Figura 152. Distribución de los linajes de MTBC en función del país de origen de los pacientes.

Los linajes fueron asignados mediante tipado de SNP. El tamaño de los círculos es proporcional al número de aislados.

Por lo que respecta al linaje 4, los sub-linajes más ampliamente distribuidos fueron L4.1.2 (Haarlem) y L4.3 (LAM): Europa, África, América Central y del Sur, coincidiendo con el artículo de Stucki *et al.* (41). En nuestro caso, el L4.4 (tipo S) también fue cosmopolita, mientras que el linaje L4.10 (PGG3) no estuvo tan ampliamente distribuido como en el artículo anteriormente citado. En oposición, el origen de los linajes L4.2 (Ural) y L4.6.2 (Cameroon) se focalizó en España y África. Según Stucki *et al.* (41) el L4.6.2 presenta una distribución restringida a regiones específicas de África. En este trabajo, salvo una de las 4 cepas de L4.6.2 en la que no se pudo establecer el origen, el resto pertenecían a pacientes procedentes de Mali, Senegal y España. El origen español de una de las cepas fue discrepante respecto al artículo de Stucki *et al.* (41), pero más adelante se averiguó que dicho paciente tenía ascendencia africana. Finalmente, las dos cepas de linaje 4 cuyo sub-linaje quedó sin clasificar procedían de pacientes de Bolivia y Rumanía.

Otro aspecto que se ha estudiado es la posible influencia del tiempo de residencia en España de los pacientes nacidos en otro país en función del linaje del MTBC (Figura 153). Se focalizó la atención en los linajes que no serían frecuentes en pacientes autóctonos (L1, L2 y L3) y en los geográficamente restringidos, como el L4.6.2.

Resultados y Discusión

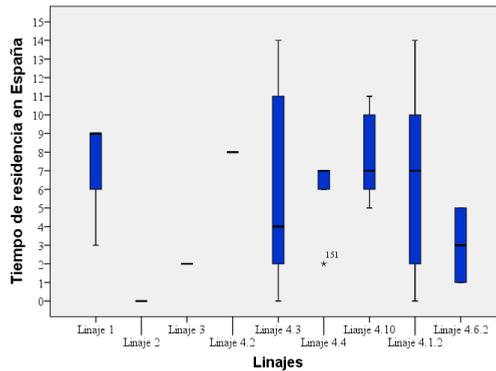


Figura 153. Estudio del linaje de las cepas procedentes de pacientes nacidos fuera de España en función del tiempo de residencia en este país.

Según la gráfica de la Figura 153, de las tres cepas de linaje 1 solo una produjo infección antes de los cinco años desde la llegada a España (inmigrante reciente). En cuanto al linaje 2, el paciente peruano desarrolló la infección en menos de un año desde su llegada. Y uno de los dos pacientes con cepas de linaje 3 fue diagnosticado a los dos años (el tiempo de residencia en España del otro paciente fue desconocido). De los dos pacientes nacidos fuera de España con cepas de linaje 4.6.2 (Cameroon), uno fue diagnosticado al año y el otro a los 5 años. Lo que apoyaría la idea de que son transmisiones en el país de origen y que se reactivarían en el país de destino. También respaldaría este hecho, junto con el origen de los pacientes, que algunos linajes podrían considerarse "generalistas", es decir, capaces de persistir en diferentes poblaciones humanas, como el L2, L4.1.2 (Haarlem) y L4.3 (LAM); y otros más "especialistas", es decir, capaces de persistir solo en una o en algunas poblaciones de huéspedes particulares (2,3,49), como el caso del L4.6.2 (Cameroon). Con lo cual, el origen geográfico de un paciente con TB es, en muchos casos, un buen predictor del linaje infectante (3,49). Esto sigue siendo cierto en áreas cosmopolitas como San Francisco, Londres y Montreal, donde los humanos y las bacterias se entremezclan (3). Además, en algunos estudios se ha demostrado que la transmisión de MTBC es más alta en las asociaciones simpátricas de huésped-patógeno que en las combinaciones alopátricas (3). Factores sociales, como la mezcla social preferencial entre grupos étnicos, es probable que expliquen algunas de estas observaciones. No obstante, hay indicios de que los factores biológicos también juegan un papel importante. Por ejemplo, Fenner *et al.* (209) en un estudio nacional de epidemiología molecular en Suiza, encontraron que la transmisión reciente de cepas de MTBC simpátricas era más probable que la de las cepas alopátricas entre los pacientes nacidos en Europa. También destacaron que, a diferencia de los pacientes con tuberculosis VIH-negativos, los pacientes que estaban infectados por el VIH tenían más probabilidades de estar asociados con un linaje alopátrico de MTBC (209). Esta asociación se hizo más fuerte con el aumento

de la supresión inmunológica, inversamente proporcional al recuento de células T CD4+ (209).

Para comprobar si este hecho se reproduce en nuestro estudio, en la Figura 154 se representa la distribución de los linajes en función del origen del paciente y la presencia o no de coinfección por el VIH. Sin embargo, en las cepas de pacientes españoles, con o sin VIH, no se encontraron cepas especialistas específicas de otras regiones. Posiblemente debido al escaso número de cepas incluidas pertenecientes a linajes especialistas y a que no se clasificaron los pacientes VIH en función de su estado inmunológico.

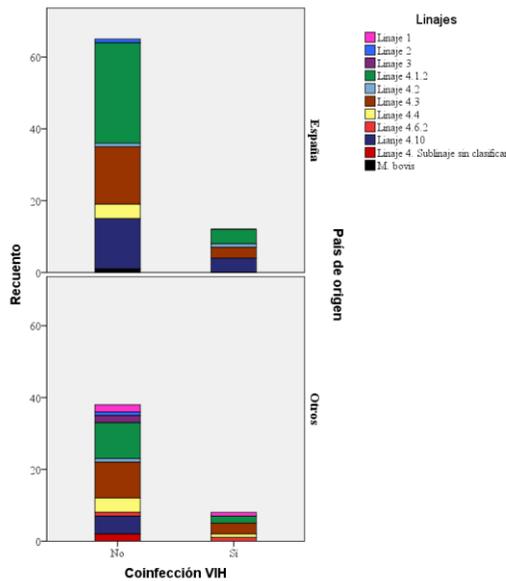


Figura 154. Distribución de los linajes en función del origen del paciente y la presencia o no de coinfección por el VIH. En un 19,5% de los pacientes se desconocía la presencia de coinfección por el VIH (datos no mostrados).

4.8.7 Linajes del MTBC y presentación de la enfermedad

Para examinar el posible efecto del linaje sobre la presentación de la enfermedad, los casos de tuberculosis pulmonar, extrapulmonar o miliar se estratificaron según el linaje (Figura 155 y Tabla 38). Se aprecia que el linaje L4.1.2 (Haarlem), predominante en este estudio (35,71%), también lo es en las tres entidades: TB pulmonar (63,67%), extrapulmonar (31,82%) y miliar (33,33%). El linaje L4.3 (LAM) es el segundo más frecuente en TB pulmonar (25,83%) y extrapulmonar (22,73%), y también lo es globalmente (25,32%); mientras que en la TB miliar (25,00%) está al mismo nivel que el L4.10 (PGG3, el tercero más frecuente a nivel global, 20,13%). Se observa que la TB miliar (7,79%) y extrapulmonar (14,29%) están más repartidas entre los distintos linajes que la TB pulmonar (77,92%), posiblemente debido al diferente número de cepas incluidas en cada entidad.

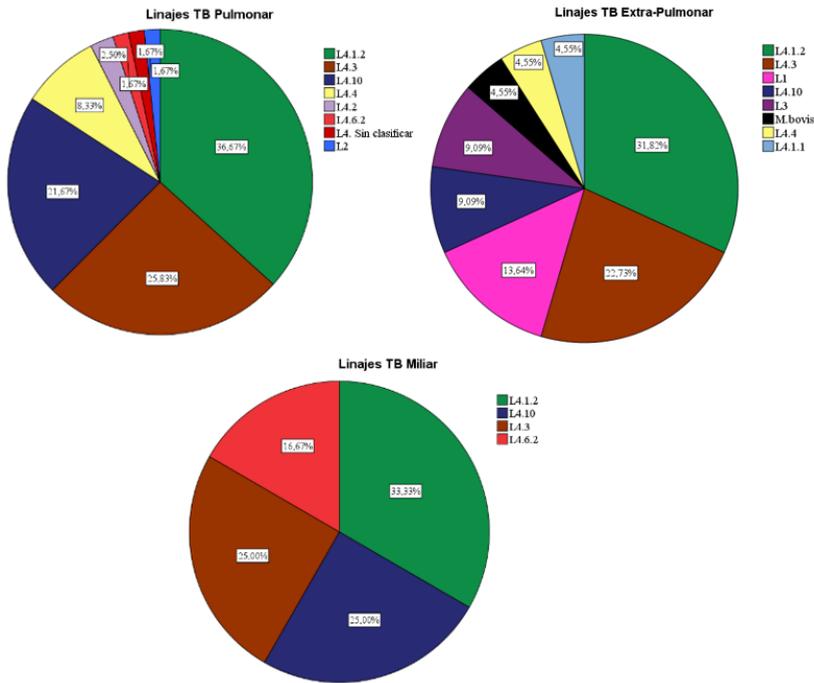


Figura 155. Frecuencias relativas de los linajes en función del diagnóstico de TB. Linajes clasificados mediante tipado de SNP.

Cabe destacar que todos los pacientes infectados por cepas de linaje 1 (n = 3) y linaje 3 (n = 2) desarrollaron TB extrapulmonar. Mientras que, las dos cepas de linaje 2 ocasionaron infecciones pulmonares. Dentro del linaje 4, los sub-linajes con mayor número de aislados: L4.1.2, L4.3 y L4.10, se asociaron con más frecuencia con la TB pulmonar (80,00%, 79,49% y 83,87%,

respectivamente). Lo que tendría sentido, teniendo en cuenta que la transmisión de la tuberculosis es mediante esta vía (67).

Tabla 38. Frecuencias absolutas de los linajes en función del diagnóstico de TB.

Linaje	TB pulmonar	TB extrapulmonar	TB miliar
L1	0	3	0
L2	2	0	0
L3	0	2	0
L4.1.1	0	1	0
L4.1.2	44	7	4
L4.2	3	0	0
L4.3	31	5	3
L4.4	10	1	0
L4.6.2	2	0	2
L4.10	26	2	3
L4. Sin clasificar	2	0	0
<i>M. bovis</i>	0	1	0

En la literatura existe controversia en cuanto a la asociación de los linajes de *M. tuberculosis* y el sitio de infección. Por ejemplo, en el mismo sentido que nuestra observación, Click *et al.* (210) observaron que los linajes 1 y 3 se asociaban con tuberculosis extrapulmonar y el linaje 2 con TB pulmonar. Ellos controlaron incluso posibles factores de confusión, como la región de nacimiento del paciente, la raza/etnia, el género, el estado de infección por VIH y la edad, concluyendo que sí existe dicha asociación. En cambio, Kong *et al.* informaron de una asociación entre el linaje 2 y la TB extrapulmonar (211,212).

Por otro lado, hay estudios donde no se observa asociación entre el linaje del MTBC y la forma de presentación de la enfermedad; como Pareek *et al.* (213), quienes consideran que la etnicidad es un poderoso determinante de la manifestación clínica de la TB, independientemente del linaje micobacteriano. Reed *et al.* (49) tampoco observaron diferencias significativas entre los linajes con respecto a su asociación con enfermedad pulmonar o extrapulmonar.

Dadas las interacciones complejas entre el huésped, el patógeno y el medio ambiente, la vinculación de la diversidad genotípica del MTBC con los fenotipos experimentales y clínicos requiere de más estudios con un enfoque holístico de epidemiología de sistemas integrado en un sólido marco evolutivo (66).

4.9 Secuenciación de genoma completo (WGS)

Se secuenciaron 55 cepas de las 155 de partida mediante la metodología descrita en el apartado 3.13. Las cepas secuenciadas llevan el prefijo ICHGUV, salvo cuatro cepas con el prefijo CHGUV, las cuales se secuenciaron *a posteriori*: CHGUV038, CHGUV154, CHGUV269 y CHGUV280. Se empleó un control interno, basado en una misma cepa con dos identificadores distintos (ICHGUV1008 e ICHGUV1449), no encontrándose ninguna diferencia de SNP entre ellas.

4.9.1 Tipificación mediante WGS

Los resultados obtenidos mediante secuenciación se muestran en la Figura 145 (apartado 4.8.2). En ella se observa un árbol filogenético radial obtenido a partir de los datos de WGS usando el método *Neighbor Joining*. La longitud de las ramas indica el número de diferencias genéticas (SNP) que tiene cada una de ellas.

4.9.1.1 Determinación de patrones agrupados y únicos

Se detectaron 18 cepas (32,73%) relacionadas con procesos de transmisión, formando parte de seis complejos clonales, con un mínimo de dos cepas y un máximo de seis. Los CC se representan en la Tabla 39. Las 37 cepas restantes fueron consideradas patrones únicos (67,27%).

Tabla 39. Detección de complejos clonales mediante WGS del subgrupo de 55 cepas estudiadas.

Se emplea la misma numeración de los CC que con la técnica MIRU-VNTR 24 loci (Tabla 41). Obsérvese que el CC 5 no se considera agrupación mediante WGS. Prefijos de las cepas: sin prefijo = CHGUV; G = ICHGUV.

CC	WGS		
	n	Cepas	Probabilidad
#1	6	038, 269, 280, G1590, G249, 154	Muy probable
#2	3	G839, G850, G1015	Muy probable/ Probable
#3	2	G251, G846	Poco probable
#4	2	G538, G848	Probable
#5	0	-	-
#6	3	G1008, G1011, G1449	Muy probable
#7	2	G1000, G1012	Probable
Total	18		

A continuación, se expone cada uno de los CC establecidos mediante WGS, con la información extra que aporta esta tecnología a la hora establecer conexiones moleculares entre casos.

Complejo clonal 1

En la Figura 156 se muestra los integrantes del CC 1, donde se observa cómo a partir del antepasado reciente más probable (MLRA) se establecen tres posibles cadenas de transmisión. Dos de las cuales están formadas por cepas

incluidas en este estudio. Una de esas cadenas de transmisión está constituida por la cepa CHGUV154 aislada en diciembre de 2009 y la cepa CHGUV280 en noviembre de 2010. Ambas cepas están separadas entre sí por 10 SNP de diferencia, existiendo entre ambas un caso perdido y otro no incluido en este estudio. La distancia de CHGUV154 y CHGUV280 respecto al MLRA son 6 y 8 SNP, respectivamente.

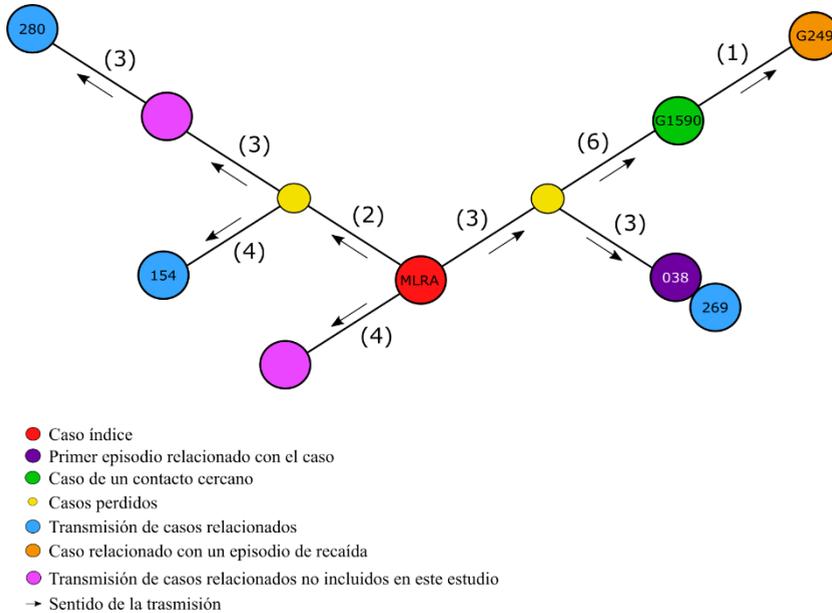


Figura 156. Posible ruta de transmisión establecida mediante WGS para el CC 1. Prefijos de las cepas: sin prefijo = CHGUV; G = ICHGUV. Los valores entre paréntesis son los SNP de diferencia entre las cepas (sin tener en cuenta las resistencias). Abreviaturas: MLRA – antepasado reciente más probable, se infiere para darle direccionalidad a la transmisión. Figura cedida por el grupo del Dr. Iñaki Comas¹⁵, adaptada posteriormente.

La otra cadena de transmisión la comprenden las cepas: CHGUV038 obtenida del paciente A en abril de 2009, CHGUV269 aislada del paciente C en octubre de 2010, ICHGUV1590 obtenida del paciente B en enero de 2013 e ICHGUV249 de junio de 2014 perteneciente al paciente A. Entre las dos primeras cepas no existe diferencia de SNP, pero sí difieren en la frecuencia del SNP ubicado en la posición genómica 939197. La cepa CHGUV269 tiene ese SNP fijado. En cambio, la cepa CHGUV038 lo tiene a una frecuencia del 15%. Este hecho unido a que durante el análisis bioinformático solo se comparan pares de aislados (*pairwise*) con SNP fijados en la población bacteriana, implica que las diferencias entre dichas cepas y el resto no sean las mismas para ambos casos, incrementándose siempre en un SNP de diferencia

¹⁵ Esta cadena de transmisión está pendiente de ser publicada por el grupo del Dr. Iñaki Comas (artículo en revisión).

para la cepa CHGUV269 respecto a la CHGUV038 (téngase en cuenta en la comparación de distancias que se verá más adelante). Una vez aclarado este aspecto, comentar que dichas cepas proceden de dos pacientes distintos sin una relación epidemiológica evidente, salvo que comparten la misma área de atención primaria. Difieren del MLRA en 6 SNP (1 SNP más para la cepa CHGUV269). A su vez, dichas cepas difieren de la cepa ICHGUV1590 en 9 SNP, siendo esta última una cepa obtenida del paciente B, hermano del paciente A. Cabe destacar que la cepa ICHGUV1590 es monorresistente a RMP (mutación I491F que afecta al gen *rpoB*; visto en el apartado 4.6.2.2), a diferencia de las otras dos cepas. Por esta razón, la diferencia de SNP entre ellas pasaría de 9 a 10.

La última cepa de este CC, ICHGUV249, es MDR. La cual presentó la misma mutación en el gen *rpoB* que la cepa ICHGUV1590, detectándose además resistencia fenotípica y genotípica a isoniazida (mutación G273R del gen *katG*, visto en los apartados 4.6.1 y 4.6.2.2). Con lo que, la diferencia entre las cepas ICHGUV249 e ICHGUV1590, se incrementa en un SNP más de diferencia, siendo dos en total. Cabe destacar que la cepa ICHGUV249, aislada en junio de 2014, procede del mismo paciente (paciente A) que la cepa CHGUV038, de abril de 2009, con una diferencia de 10 + 2 SNP (debido a la resistencia), habiendo transcurrido entre ellas cinco años y dos meses. Además, es probable que el paciente B (cepa ICHGUV1590) se infectase durante el episodio de recaída de su hermano, el paciente A.

La cadena de transmisión entre los pacientes A, B y C según la Figura 156, puede sugerir que hubo una transmisión en primer lugar entre los pacientes A y C. No obstante, se desconoce el sentido de esa transmisión, es decir, si fue del paciente A al C o viceversa. Posteriormente, el paciente A infectó al hermano (paciente B) presentándose a su vez dos posibilidades:

- a) Que la cepa del paciente A adquiriese resistencia a rifampicina e infectase a su hermano (paciente B).
- b) O que durante el episodio de recaída del paciente A, éste hubiese infectado al hermano (paciente B), dentro del cual la cepa se habría vuelto resistente a rifampicina y después, habría vuelto a infectar al paciente A (reinfección o sobreinfección).

Con los datos disponibles no se puede asegurar cómo fue la transmisión, solo se puede hablar de probabilidades. Lo que sí se puede confirmar es que hubo una evolución de una cepa dentro de un paciente o entre pacientes, desde una población sensible (CHGUV038) a una resistente (ICHGUV1590), para finalmente llegar a una MDR (ICHGUV249)¹⁶.

Este CC se corresponde con el CC 2 cuando se consideran las 155 cepas (visto en el apartado 4.7.2.2).

¹⁶ La información sobre la transmisión dentro de este CC fue cedida por el grupo del Dr. Comas.

Complejo clonal 2

El CC 2 está formado por tres cepas, cuya topología de transmisión inferida mediante WGS se muestra en la Figura 157. Sugiere la existencia de un caso perdido (MLRA) con los alelos de tipo salvaje, a partir del cual probablemente se habría originado la transmisión. La distancia entre el MLRA y las cepas ICHGUV839, ICHGUV850 y ICHGUV1015 fueron de 1, 4 y 3 SNP, y se aislaron en diciembre de 2014, febrero de 2015 y julio de 2015, respectivamente. No se estableció ninguna relación epidemiológica entre ellas.

Este CC se corresponde con el CC 6 cuando se consideran las 155 cepas (visto en el apartado 4.7.2.2).

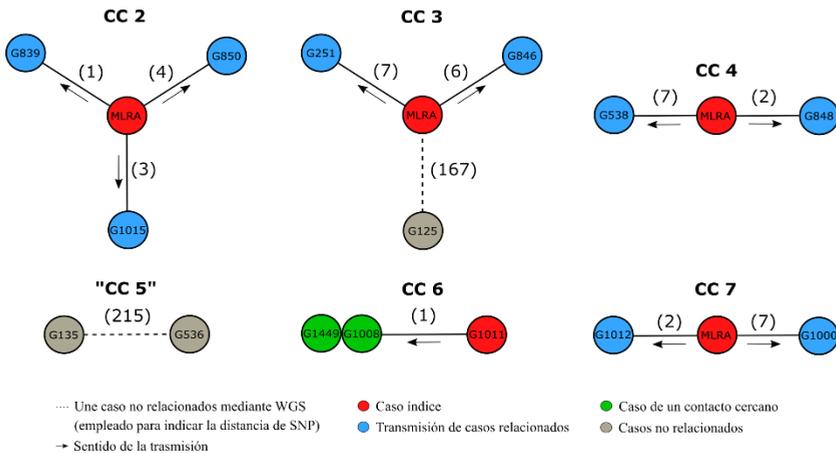


Figura 157. Topologías de la transmisión inferidas mediante WGS para los CC del 2 al 7. Prefijos de las cepas: sin prefijo = CHGUV; G = ICHGUV. Los valores entre paréntesis son los SNP de diferencia entre las cepas. Se incluye el “CC 5” aunque no sea un CC obtenido mediante WGS, para la posterior comparación con la técnica MIRU. Abreviaturas: MLRA – antepasado reciente más probable, contiene los SNP *wild type* y se infiere para darle direccionalidad a la transmisión.

Complejo clonal 3

Este CC está integrado por la cepa ICHGUV251 obtenida en junio de 2014 y la cepa ICHGUV846 en marzo de 2015. La topología del CC3 de la Figura 157 sugiere la existencia de un caso perdido entre ambas cepas (MLRA), el cual podría ser el origen de la transmisión entre los casos estudiados. Pero no es posible asegurarlo taxativamente debido a la ausencia de datos epidemiológicos que lo sustenten. La distancia entre los dos casos y el MLRA fueron de 7 y 6 SNP, respectivamente. En la figura anterior aparece también la muestra G125, aislada en enero de 2014, con una diferencia de SNP superior a quince, por lo que no se considera dentro de este CC desde el punto de vista de la WGS. Esto quiere decir que entre la cepa G125 y las otras dos es muy probable que existan muestras cercanas (casos perdidos) que le den sentido a la transmisión.

Este CC se corresponde con el CC 3 cuando se consideran las 155 cepas (visto en el apartado 4.7.2.2).

Complejo clonal 4

Está formado por la cepa ICHGUV538 aislada en octubre de 2014 y la cepa ICHGUVG848 en marzo de 2015, distanciadas entre sí por 9 SNP. No obstante, según el método de WGS empleado, entre ambas cepas existe un caso perdido, con el cual habría una diferencia de 7 SNP respecto a la cepa ICHGUV538 y 2 SNP con la ICHGUVG848 (Figura 157). Esto sugiere que probablemente la transmisión entre los dos casos no haya sido directa. Para conocer el origen de la transmisión sería necesario el estudio de otras variables epidemiológicas que no pudieron ser obtenidas.

Este CC se corresponde con el CC 9 cuando se consideran las 155 cepas (visto en el apartado 4.7.2.2).

Complejo clonal 6

El CC 6 está constituido por la cepa ICHGUV1011 aislada el 08 de julio de 2015 de la paciente F y las cepas ICHGUV1499 e ICHGUV1008. Estas últimas eran en realidad la misma cepa, identificada con dos códigos distintos para ser utilizada de control interno. Dicha cepa fue obtenida el 22 de julio de 2015 del paciente G. Como cabía esperar las cepas ICHGUV1008 y ICHGUV1499 fueron idénticas por WGS. A su vez, presentaron una diferencia de un SNP respecto la cepa ICHGUV1011. Según la topología inferida por WGS mostrada en la Figura 157, es probable que la paciente F infectase al paciente G.

Según datos de la historia clínica, se sabía que este CC estaba formado por familiares convivientes, el paciente G era el padre de la paciente F, por lo que existía una relación epidemiológica fiable. La baciloscopia de la muestra respiratoria de la hija fue positiva y se obtuvo catorce días antes que la del padre, coincidiendo con lo inferido mediante WGS (Figura 158, hipótesis A). No obstante, cabe recalcar que normalmente son los padres los que contagian a los hijos (214), por lo que también se barajan otras posibles hipótesis. Por ejemplo, puede que el padre estuviese infectado por las dos poblaciones consecuencia de la microevolución intrapaciente (215,216) y que la cepa menos evolucionada infectase a la hija (Figura 158, hipótesis B), pero posteriormente, no se pudo aislar en la muestra obtenida del padre. Otra posible hipótesis sería la existencia de un tercer caso infectado con la cepa salvaje, idéntica a la cepa ICHGUV1011 de la hija, que habría sido transmitida tanto a la hija como al padre y que, posteriormente, en el padre esa cepa evolucionó hasta la cepa ICHGUV1008 o ICHGUV1499, con un SNP de diferencia (Figura 158, hipótesis C).

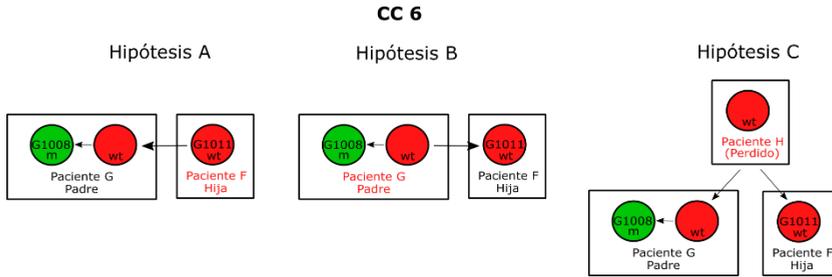


Figura 158. Hipótesis sobre la posible transmisión de las cepas del CC6, según los datos obtenidos mediante WGS.

La tipografía en color rojo de los pacientes indicaría el posible origen de la transmisión. Abreviaturas: m – cepa con la mutación; wt – cepa salvaje.

Otro factor a tener en cuenta es que el padre estaba diagnosticado de EPOC. En la literatura se ha descrito tanto la EPOC y su tratamiento como factores de riesgo de la TB, como la TB como comorbilidad de la EPOC (217-220). Lo que apoyaría todas las hipótesis mencionadas. Por lo que respecta al diagnóstico del padre, otra posibilidad que debe ser considerada es que bajo la clínica de la EPOC también pudo subyacer una TB y que no se diagnosticase hasta que la hija debutó con la enfermedad. Este hecho reforzaría la hipótesis B (Figura 158), puesto que habría permitido la transmisión padre-hija de la cepa salvaje y la microevolución de esta cepa en el padre.

Este CC se corresponde con el CC 16 cuando se consideran las 155 cepas (visto en el apartado 4.7.2.2).

Complejo clonal 7

El CC 7 lo comprenden las cepas ICHGUV1000 e ICHGUV1012. Entre ambas existe una diferencia de 9 SNP. No obstante, según la Figura 157 existiría un caso perdido, ancestro de los otros dos, con una diferencia de 7 y 2 SNP respecto a las cepas ICHGUV1000 e ICHGUV1012, respectivamente.

Este CC se corresponde con el CC 17 cuando se consideran las 155 cepas (visto en el apartado 4.7.2.2). Se sabe que la cepa ICHGUV1012 se aisló de una biopsia de ganglio (BAAR positivo) obtenida el 13 de mayo de 2015 del paciente A y la cepa ICHGUV1000 se obtuvo de un esputo del día 18 de ese mismo mes del paciente B (BAAR negativo). Según el facultativo responsable del paciente B, este paciente no tenía criterios clínicos de infección tuberculosa (a pesar de que se solicitase expresamente el estudio de TB) y lo consideró como una contaminación cruzada de laboratorio. Existen tres hechos que respaldarían esta hipótesis. En primer lugar, este paciente tuvo una muestra de esputo de dos días antes negativa para TB, aunque fue de peor calidad. En segundo lugar, el procesamiento de la muestra del paciente B, se hizo en la misma tanda que otra muestra del paciente A, un aspirado bronquial con baciloscopia positiva, la cual no fue secuenciada ni incluida en el estudio (Figura 159). Y, en tercer lugar, la muestra del 18 de mayo del paciente A

Tabla 40. Estadística de los casos agrupados y únicos. Genotipado mediante WGS.
 No se han tenido en cuenta los casos duplicados (2 pacientes duplicados, n = 53). El grado de asociación y la significación estadística (p valor) se calculó con un índice de confianza del 95% empleando las pruebas estadísticas adecuadas (véase la Tabla 23). NA – No aplicable, debido al bajo número de casos en una o varias casillas.

Características	Agrupados n (%) N = 16	Únicos n (%) N = 37	Grado de asociación p valor	χ^2 p valor
Edad			0,013	NA
<15	0 (0,00)	3 (8,11)		
15 – 29	2 (12,50)	7 (18,92)		
30 – 44	9 (56,25)	13 (35,14)		
45 – 59	4 (25,00)	7 (18,92)		
≥ 60	1 (6,25)	7 (18,92)		
Género			0,149	0,279
Mujer	4 (25,00)	15 (40,54)		
Hombre	12 (75,00)	22 (59,46)		
País de origen			0,149	0,279
España	12 (75,00)	22 (59,46)		
Otro origen	4 (25,00)	15 (40,54)		
Diagnóstico (sitio de la infección)			0,249	NA
Pulmonar	15 (93,75)	27 (72,97)		
Extrapulmonar	0 (0,00)	5 (13,51)		
Miliar	1 (6,25)	5 (13,51)		
Bacilíferos	11 (73,33)	15 (46,88)	0,248	0,089
Coinfección por el VIH	3 (21,43)	3 (8,33)	0,181	0,201
Situación evolutiva			0,313	NA
Casos nuevos	13 (86,67)	36 (100)		
Casos tratados previamente	2 (13,33)	0 (0)		
Otras				
Alcoholismo	1 (6,67)	7 (20,59)	0,174	0,224
Diabetes	1 (6,25)	6 (16,22)	0,135	0,325
Neoplasia	2 (12,50)	4 (11,11)	0,020	0,885
UDVP	0 (0,00)	1 (2,78)	0,091	NA
Linajes			0,426	NA
L4.1.2	9 (56,25)	8 (21,62)		
L4.3	5 (31,25)	9 (24,32)		
L4.4	0 (0,00)	4 (10,81)		
L4.10	2 (12,50)	11 (29,73)		
Otros	0 (0,00)	5 (13,51)		

*Diferencias estadísticamente significativas.

Según las pruebas estadísticas empleadas con los datos de la Tabla 40, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre la variable agrupamiento y las variables estudiadas. Este hecho se debe en parte al bajo número de casos analizados (n = 53). Por lo que respecta a los distintos grupos de edad, se observa que más de la mitad de los casos agrupados están comprendidos entre los 30 y 44 años. Mientras que, en los casos únicos las edades están más repartidas. Los hombres predominaron en los casos agrupados, con una proporción de 3:1. Sin embargo, en los casos únicos esta diferencia prácticamente se desvanece. El origen español fue más frecuente entre los casos relacionados con transmisión reciente (proporción 3:1); no

observándose esta diferencia entre los casos únicos. La TB respiratoria fue la entidad mayoritaria entre los casos agrupados con más del 90%. Este porcentaje se redujo en torno al 70% en los casos únicos. En cuanto al estado bacilífero de los pacientes, casi tres cuartas partes de los casos agrupados presentaron baciloscopias positivas, respecto a casi un 50% de los casos únicos. La coinfección por el VIH se situó alrededor del 20% en los casos agrupados y próxima al 10% en los casos únicos. Todos los patrones únicos fueron casos nuevos, salvo un caso cuya situación evolutiva fue desconocida y no se tuvo en cuenta en la estadística. Mientras que, los dos únicos casos conocidos con tratamiento previo se incluyeron en los casos agrupados, siendo uno un fracaso y otro un abandono de tratamiento. Lo que habría permitido la transmisión de dichas cepas a otras personas. El linaje que más destacó entre los casos agrupados fue el L4.1.2 con más del 50%, siendo este porcentaje superior al obtenido por este linaje en los casos únicos. Por el contrario, el L4.4 y el grupo “otros linajes” solo se aislaron de pacientes no relacionados con transmisión reciente.

4.9.2 Comparación respecto MIRU-VNTR de 24 loci

Los resultados del genotipado mediante MIRU-VNTR de 24 *loci* para las 55 cepas secuenciadas, se muestran en el Apéndice VII: Cepas estudiadas mediante MIRU-VNTR 24 *loci*. Las cepas secuenciadas son un subgrupo dentro de las 155 cepas cuyos resultados se han expuesto anteriormente y se diferencian por el prefijo ICHGUV, salvo las cepas secuenciadas posteriormente: CHGUV038, CHGUV154, CHGUV269 y CHGUV280.

Mediante la plataforma *on-line* MIRU-VNTR_{plus} se realizó un árbol filogenético basado en el método *Neighbor Joining* (véase la Figura 146 del apartado 4.8.3) y un árbol de mínima expansión (MST, Figura 160) para poder identificar los complejos clonales.

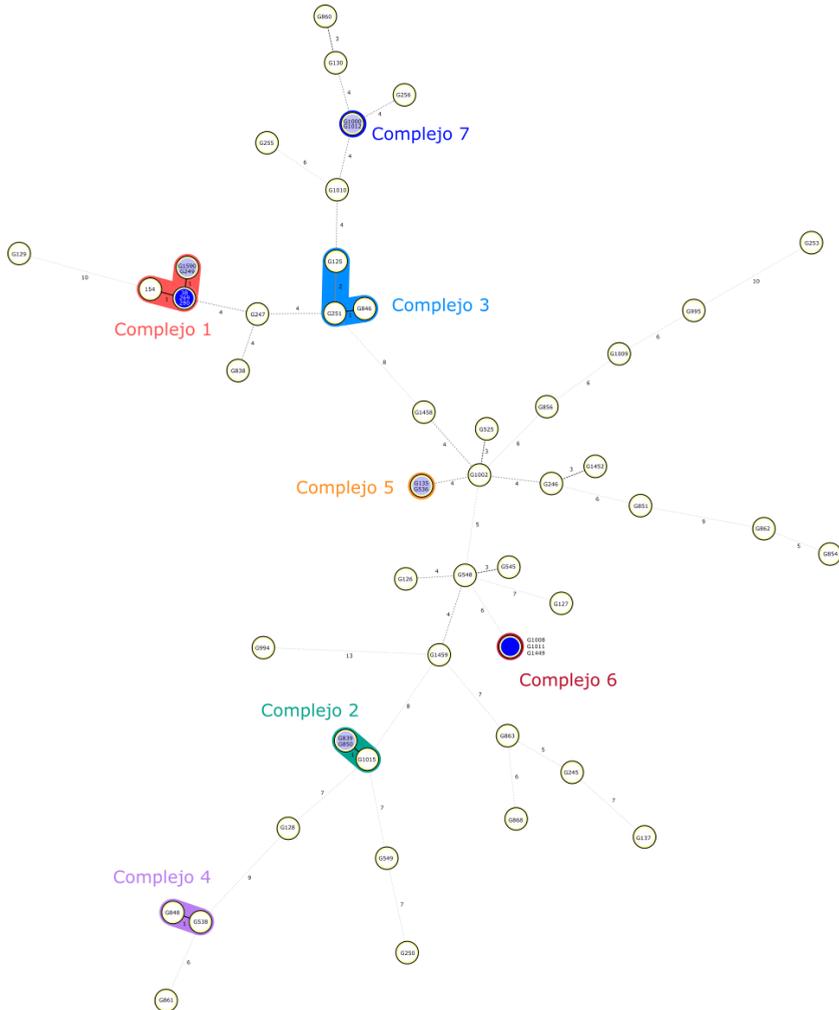


Figura 160. Árbol de mínima expansión construido a partir de los aislados clínicos estudiados mediante MIRU-VNTR 24 *loci* (N = 55), con una diferencia máxima entre CC de 2 *loci*. Prefijos de las cepas: sin prefijo = CHGUV; G = ICHGUV. Obtenida de la plataforma *online* MIRU-VNTRplus y adaptada posteriormente mediante el programa Inkscape.

La genotipificación MIRU identificó siete CC con un porcentaje de cepas agrupadas del 38,18% (n = 21) empleando el umbral de como máximo dos *loci* de diferencia (Figura 160 y Figura 161). Si el umbral se reduce a como máximo un *locus* diferente, el número de CC se mantiene, pero sí se reduce el porcentaje de cepas agrupadas a un 36,36% (n = 20). Y si solo se consideran los CC con idéntico mirutipo, el número de CC disminuye a cinco (teniendo en cuenta que el CC1 se subdivide en el CC 1a y el CC 1b, Tabla 41), y también el porcentaje de cepas agrupadas, situándose en un 25,45% (n = 14).

Resultados y Discusión

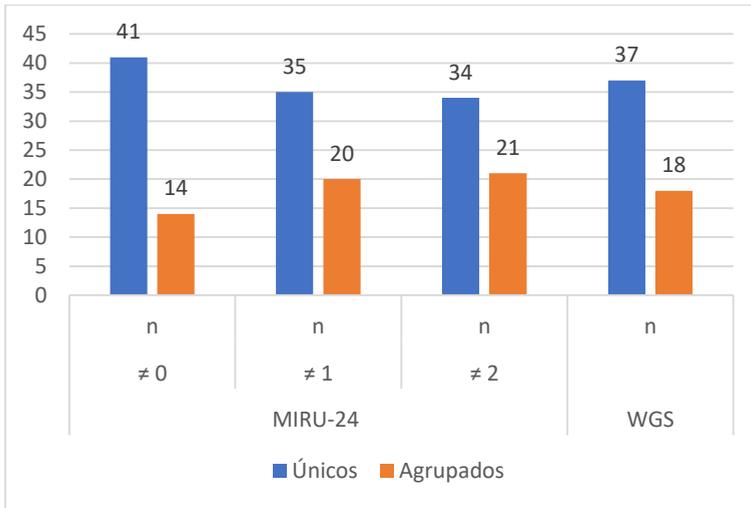


Figura 161. Diagrama de barras con las frecuencias absolutas de las cepas agrupadas o no en función de la metodología empleada: WGS o MIRU-VNTR 24 *loci*. Para la metodología MIRU se establecen tres umbrales: idéntico mirutipo ($\neq 0$), diferencia máxima de 1 *locus* ($\neq 1$) o diferencia máxima de 2 *loci* ($\neq 2$). N = 55 cepas.

Si se compara los datos anteriores con la tipificación mediante WGS (visto en el apartado 4.9.1.1), se observa que con la secuenciación se obtiene un CC menos que con la metodología MIRU empleando el umbral de 2 *loci* y 1 *locus*; y uno más que con el umbral de 0 *loci*. En cuanto al porcentaje de cepas agrupadas, la secuenciación también se sitúa entre el umbral de 1 *locus* y 0 *loci*, con un valor de 32,73%.

Los complejos clonales obtenidos mediante MIRU en función del umbral establecido, así como su comparación respecto a la secuenciación, se muestran en la Tabla 41 (obtenida a partir de la Figura 160).

Tabla 41. Detección de complejos clonales mediante MIRU-VNTR 24 loci del subgrupo de 55 cepas estudiadas, en función del umbral establecido: idéntico mirutipo ($\neq 0$), diferencia máxima de 1 locus ($\neq 1$) o diferencia máxima de 2 loci ($\neq 2$).

La última columna indica el CC al que pertenecen teniendo en cuenta las 155 cepas. Prefijos de las cepas: sin prefijo = CHGUV; G = ICHGUV. Leyenda: “;” separa cepas con distinto mirutipo; “-” separa cepas con idéntico mirutipo; tipología negrita con sombreado amarillo – idéntico mirutipo; tipología normal con sombreado amarillo - diferencia máxima de 1 locus; tipología normal - diferencia máxima de 2 loci; color rojo – discrepancias respecto a la WGS.

CC	MIRU			Cepas	CC N = 155
	n ($\neq 0$)	n ($\neq 1$)	n ($\neq 2$)		
#1	5	6	6	038-269-280; G1590-G249; 154	#2
#2	2	3	3	G839-G850; G1015	#6
#3	0	2	3	G251; G846; G125	#3
#4	0	2	2	G538; G848	#9
#5	2	2	2	G135-G536	#13
#6	3	3	3	G1008-G1011-G1449	#16
#7	2	2	2	G1000-G1012	#17
Total	14	20	21		

A continuación, se comentan las coincidencias y las discrepancias entre los CC establecidos por las dos metodologías, de acuerdo con la Tabla 39 (WGS) y la Tabla 41 (MIRU).

Complejo clonal 1

Si se comparan los datos con los obtenidos por WGS, la tipificación MIRU separa bien la cepa CHGUV154 por un lado, y las cepas ICHGUV1590 y ICHGUV249 por otro; a ambos lados del grupo formado por las cepas CHGUV038, CHGUV269 y CHGUV280. Sugiriendo la posibilidad de dos rutas evolutivas distintas (Figura 156 y Figura 162). No obstante, no discrimina lo suficiente para separar a la cepa CHGUV280 de la CHGUV269 y CHGUV038. Lo cual puede ser debido a que la transmisión no es continua y que, en algún momento, el aislado CHGUV154 ganó una copia extra del locus 960 (MIRU 10). Es decir, es muy probable que entre las muestras CHGUV154 y CHGUV280, hayan sucedido otros eventos de transmisión que no tenemos muestreados.

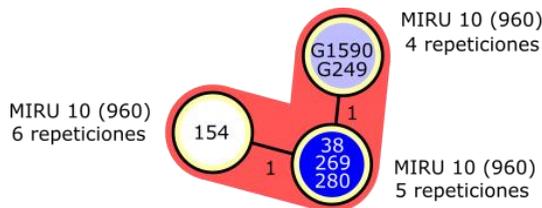


Figura 162. Cepas incluidas en el complejo clonal 1 tipado mediante MIRU-VNTR 24 loci.

Resultados y Discusión

Se indican las diferencias existentes entre ellas. Prefijos de las cepas: sin prefijo = CHGUV; G = ICHGUV.

Las diferencias entre ambas técnicas se representan en la Figura 163. Como ya se comentó anteriormente, cabe destacar que las cepas CHGUV038 y la ICHGUV249 se aislaron de dos esputos pertenecientes a un mismo paciente (paciente A), con una diferencia de tiempo entre ellas de cinco años y dos meses. Esto se tradujo en una diferencia de un *locus* mediante MIRU-VNTR 24 *loci* y de 12 SNP mediante WGS. También es importante resaltar que entre la cepa ICHGUV249 del paciente A obtenida en junio de 2014 y la cepa ICHGUV1590 del hermano del paciente A (paciente B) en enero de 2013 (7 meses de diferencia), se hallaron 2 SNP de diferencia por WGS; mientras que, con MIRU-24 presentaron el mismo mirutipo. En estos dos casos se observa que los cambios producidos en las regiones repetitivas MIRU se produjeron más lentamente en el tiempo que las variaciones de SNP, indicativo de que la metodología WGS presenta una mayor resolución que la metodología MIRU (40,115,160,161,227,228).

Por lo que respecta a la sensibilidad a fármacos, se observa que la cepa ICHGUV1590 resistente a RMP y la cepa ICHGUV249 resistente a RMP-INH, presentan un mismo patrón MIRU. Mientras que por secuenciación, ambas cepas están distanciadas por dos SNP, uno de los cuales está implicado en la resistencia a INH.

Finalmente indicar que este agrupamiento se corresponde con el CC2 cuando se consideran las 155 cepas.

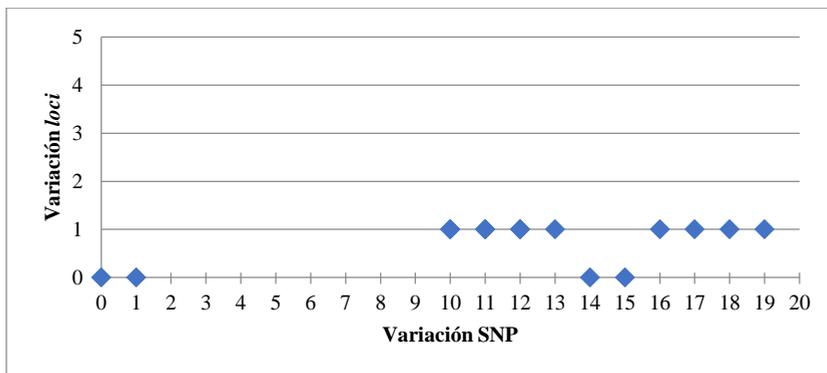


Figura 163. Comparación de los resultados obtenidos con la metodología WGS (variación de SNP) respecto a MIRU-VNTR-24 *loci* (variación de *loci*) para el CC1.

Complejo clonal 2

La topología de este CC mediante MIRU-VNTR 24 se muestra en la Figura 164, mientras que la inferida mediante WGS ya se ha visto en la Figura 157. Por un lado, se observa que la cepa ICHGUV839 y la cepa ICHGUV850 presentan el mismo mirutipo, pero difieren entre sí en 5 SNP. Por otro lado, la

cepa ICHGUV1015 difiere en una repetición más en el MIRU 802 respecto a las cepas anteriores, y en 4 y 7 SNP respecto a ICHGUV839 e ICHGUV850, respectivamente.

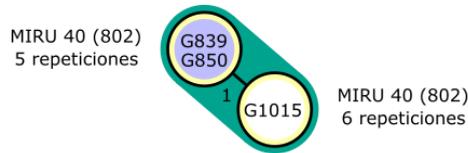


Figura 164. Cepas incluidas en el complejo clonal 2 tipado mediante MIRU-VNTR 24 *loci*. Se indican las diferencias existentes entre ellas. Prefijos de las cepas: G = ICHGUV.

Complejo clonal 3

Las topologías de este CC se muestran en la Figura 165 y en la Figura 157, inferidas mediante MIRU-VNTR 24 y WGS, respectivamente. Las cepas ICHGUV251 e ICHGUV846 están distanciadas por 13 SNP mediante WGS y por la variación de un solo *locus* mediante MIRU-VNTR 24, incluyéndose dentro del mismo CC por ambas técnicas. En cambio, la cepa ICHGUV125 está distanciada de la cepa ICHGUV251 por 2 *loci* mediante MIRU, pero se diferencia en 174 SNP por WGS, no siendo englobada por tanto en el mismo CC mediante esta técnica.

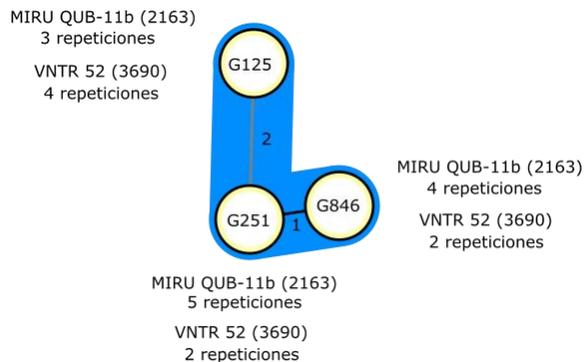


Figura 165. Cepas incluidas en el complejo clonal 3 tipado mediante MIRU-VNTR 24 *loci*. Se indican las diferencias existentes entre ellas. Prefijos de las cepas: G = ICHGUV.

Complejo clonal 4

Las cepas ICHGUV848 e ICHGUV538 difieren en un *locus* de diferencia mediante MIRU (Figura 166), mientras que por secuenciación se diferencian en 9 SNP (Figura 157). Además, como ocurre en los casos anteriores, la metodología MIRU no permite inferir posibles casos perdidos entre ambas cepas, que sí es posible mediante WGS.

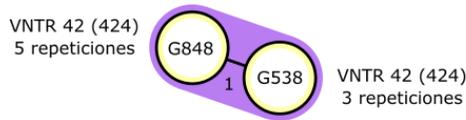


Figura 166. Cepas incluidas en el complejo clonal 4 tipado mediante MIRU-VNTR 24 loci. Se indican las diferencias existentes entre ellas. Prefijos de las cepas: G = ICHGUV.

Complejo clonal 5

En la Figura 160 se ha observado como el CC5 está formado por dos cepas, ICHGUV135 e ICHGUV536, con el mismo mirutipo mediante MIRU (Figura 160). Sin embargo, empleando la metodología WGS no se considera que ambas cepas estén relacionadas, debido a la existencia de una distancia genética entre ellas de 215 SNP (Figura 157). Por tanto, debido a que la WGS presenta una mayor resolución que la metodología MIRU (40,115,160,161,227,228) y que no se estableció ninguna relación epidemiológica, se considera este CC como un falso positivo.

Este CC se corresponde con el CC 13 cuando se consideran las 155 cepas (visto en el apartado 4.7.2.2).

Complejo clonal 6

El CC 6 está formado por las cepas ICHGUV1011, ICHGUV1008 e ICHGUV1449, con el mismo mirutipo según la técnica MIRU (Figura 160). Cabe resaltar que las dos últimas eran en realidad la misma cepa (control interno), que como ya se ha mencionado con anterioridad, fueron detectadas correctamente por ambas técnicas. Por otro lado, la WGS detectó un SNP de diferencia entre las cepas ICHGUV1008 e ICHGUV1449 (Figura 157), relacionadas epidemiológicamente.

Complejo clonal 7

Está formado por las cepas ICHGUV1000 e ICHGUV1012 con el mismo mirutipo (Figura 160). Mientras que mediante WGS, se detectó una diferencia de 9 SNP (Figura 157), con un caso perdido entre ellas.

4.9.2.1 Poder discriminatorio de las técnicas MIRU-VNTR y WGS

Para determinar el poder discriminatorio de las dos técnicas en función del umbral establecido, se calculó el índice discriminatorio de Hunter-Gaston (HGDI) (185). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 167.

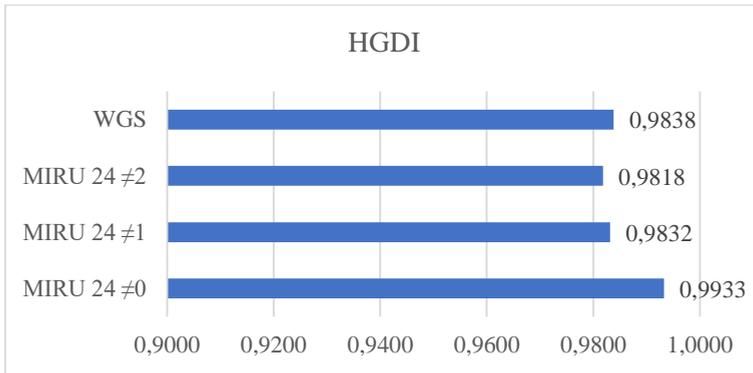


Figura 167. Comparación del índice discriminador de Hunter-Gaston (HGDI) obtenido para cada una de las dos técnicas empleadas WGS y MIRU-VNTR 24 *loci*.

Teniendo en cuenta para esta última, los distintos umbrales establecidos a la hora de asignar los complejos clonales: idéntico mirutipo ($\neq 0$), diferencia máxima de 1 *locus* ($\neq 1$) o diferencia máxima de 2 *loci* ($\neq 2$).

El mejor poder discriminador lo obtuvo la técnica MIRU-24 *loci* considerando CC solo aquellas cepas con el mismo mirutipo. La secuenciación de genoma completo obtuvo el segundo mejor poder discriminador. Seguida de cerca de la técnica MIRU-24 empleando el umbral de como máximo un *locus* de diferencia. En todos los casos se obtuvieron valores por encima de 0,9000.

4.9.2.2 Comparación de la variación de SNP respecto a la variación de *loci*

Para una mejor visualización de las diferencias entre ambas técnicas se extrajeron las distancias genéticas para cada pareja de cepas dentro de los 55 aislados clínicos analizados en función de la técnica empleada. Posteriormente, las distancias genéticas obtenidas mediante WGS (diferencias de SNP) se compararon respecto a las obtenidas mediante MIRU-VNTR 24 (*loci* diferentes) para cada par de cepas estudiadas. Los resultados de esta comparación se muestran en el Apéndice XII: Comparación WGS respecto a MIRU-VNTR 24 *loci*. Un extracto de esos resultados se ilustra en la Figura 168, la cual recoge el grupo de datos más próximo al punto de corte establecido en la WGS, permitiendo la comparación respecto a la técnica MIRU. En ella se observa que con el punto de corte de menor o igual a quince SNP mediante WGS, los *loci* diferentes con la técnica MIRU varían de cero a uno. No habiéndose encontrado ninguna diferencia de dos *loci* dentro de dicho rango. Por otro lado, sí se hallaron pares de cepas que diferían en un solo *locus* por MIRU y que superaban el umbral establecido en 16, 17 y 18 SNP mediante WGS (cepas CHGUV154-ICHGUV249, CHGUV280-ICHGUV1590 y CHGUV280-ICHGUV249, respectivamente). No obstante, aunque superaron el umbral de 15 SNP, todas ellas se englobaron en el mismo CC (CC 1). Lo cual fue indicativo de que la asignación mediante MIRU en estos casos fue correcta. También se detectó una diferencia de 215 SNP entre dos cepas (cepas

Resultados y Discusión

ICHGUV135 y ICHGUV536) sin diferencia de *loci* mediante MIRU (CC 5). Entre dichos casos no se halló ninguna relación epidemiológica y, de acuerdo con los datos obtenidos por secuenciación, se podría considerar un falso positivo de la técnica MIRU. Este hecho pudo deberse a la homoplasia inherente a esta técnica, descrita previamente en la literatura (40,42). Según la cual, un mismo perfil MIRU puede generarse a través de rutas evolutivas distintas.

Por lo que respecta a la variación de dos *loci* entre cepas, solo se hallaron en dos parejas de casos (ICHGUV125-ICHGUV251 y ICHGUV125-ICHGUV846). En las cuales existió una diferencia de SNP por WGS de 174 y 173, respectivamente. Tampoco se encontraron datos epidemiológicos que pudiesen relacionar los casos, pudiéndolos considerar como falsos positivos de la técnica MIRU.

Según la serie de 55 cepas analizadas con las dos metodologías, el punto de corte para estas cepas con la técnica MIRU-VNTR de 24 *loci* se establecería en como máximo un *locus* de diferencia.

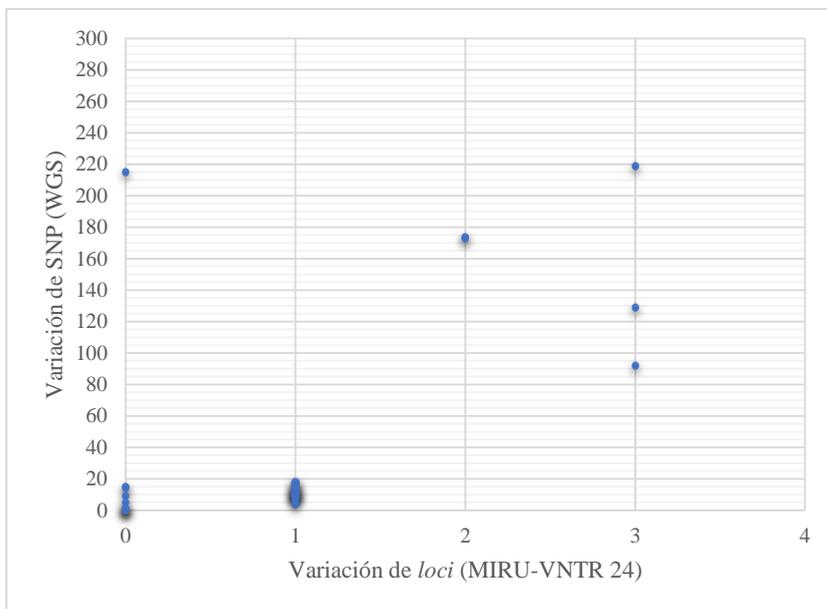


Figura 168. Comparación de MIRU-VNTR 24 *loci* respecto a WGS.

Datos pareados con las diferencias existentes entre las 55 cepas estudiadas: variación de SNP (WGS) respecto a la variación de *loci* (MIRU-VNTR 24). Se toma en cuenta exclusivamente los datos pareados con una diferencia máxima mediante MIRU de 3 *loci*. Extracto de la figura mostrada en el Apéndice XII: Comparación WGS respecto a MIRU-VNTR 24 *loci*. El sombreado de los puntos es proporcional a la frecuencia de dichos datos pareados.

A pesar de haber obtenido un mejor poder discriminatorio para la técnica MIRU-VNTR de 24 *loci* con idéntico patrón, los datos mostrados indican que

esta técnica no es la más idónea. En primer lugar, porque se deja fuera algunos casos con una diferencia entre ellos de un *locus* que, mediante WGS sí están relacionados (variación ≤ 15 SNP). Y, en segundo lugar, debido a que se halló un par de casos con idéntico mirutipo que no estaban relacionados entre sí mediante secuenciación.

En nuestro estudio el umbral de como máximo un *locus* de diferencia fue el que obtuvo mejores resultados al compararlo con la secuenciación. Sin embargo, la técnica MIRU-VNTR presenta una menor resolución a la hora de detectar transmisiones recientes de casos de TB, lo que se explica a continuación basándonos fundamentalmente en dos artículos recientes.

El primero de ellos es el artículo de Wyllie *et al.* (228), quienes evalúan de forma cuantitativa el tipado MIRU-VNTR 24 *loci* respecto a la WGS para la identificación de la transmisión de la TB. En él, de los aproximadamente 2.000 casos estudiados, solo el 18,6% de los aislamientos con perfiles idénticos MIRU-VNTR 24 *loci* fueron probablemente el resultado de una transmisión reciente al compararlos con los datos obtenidos por secuenciación. En nuestro caso, el porcentaje obtenido fue bastante superior, situándose en el 92,86%, aunque estos datos no pueden ser comparables por tres razones. En primer lugar, por las diferencias existentes entre los tamaños muestrales de ambos estudios. En segundo lugar, porque el umbral establecido por Wyllie *et al.* fue de igual o menor a cinco SNP de diferencia, mientras que en nuestro caso el umbral fue mayor (≤ 15 SNP), lo que pudo incrementar el grado de concordancia con los datos obtenidos mediante MIRU. En general, está establecido que entre 0 y 5 SNP se puede detectar una transmisión reciente, es decir, de unos tres años aproximadamente (160). Por tanto, el incremento del umbral podría tener la contrapartida de que la transmisión detectada fuese más antigua de lo esperado, pudiendo aumentar el número de casos perdidos entre dos cepas. Y, en tercer lugar, porque el porcentaje de cepas distintas al linaje 4 incluidas por Wyllie *et al.* fue del 52,28%, muy superior al de nuestro estudio (7,27%, N = 55 cepas). No habiendo encontrado en nuestro caso, agrupaciones de cepas pertenecientes a linajes distintos del L4. Este hecho es relevante, puesto que el rendimiento de la técnica MIRU-VNTR varía notablemente según el linaje, obteniendo peores resultados con linajes distintos del L4. Lo cual se demuestra también en el propio artículo de Wyllie *et al.* mediante el cálculo de la mediana de las distancias genómicas encontradas en aquellos casos pareados con idéntico patrón MIRU, teniendo en cuenta el linaje. Mientras que el linaje 4 presentó una mediana de $10 \pm 0,4$ SNP; para los linajes 1, 2, y 3 fueron de 122 ± 21 , 159 ± 3 y 82 ± 3 , respectivamente. Esto puede explicar las discrepancias del presente estudio respecto a los resultados obtenidos por Wyllie *et al.*, relacionado con que la técnica MIRU se diseñó a partir del estudio de cepas pertenecientes fundamentalmente al linaje 4.

La otra referencia actual, es el editorial de Comas *et al.* (229), donde se considera que la secuenciación, además de la precisión a la hora de determinar transmisión reciente, presenta otra ventaja importante respecto a MIRU-

VNTR, y es que puede identificar eventos de transmisión direccional (113,187,227,230), facilitando las investigaciones en situaciones difíciles. Además, permite inferir la filogenia subyacente de los casos estudiados. No obstante, no debemos olvidar que la epidemiología molecular siempre se ha de apoyar en la epidemiología clásica, permitiendo corroborar las relaciones epidemiológicas que se pudiesen inferir con las redes genómicas (161). Tampoco debemos olvidar en dicho proceso la importancia de los aspectos clínicos de los pacientes.

En cuanto al umbral empleado en el análisis de los datos obtenidos por secuenciación, algunos autores (115,160,231,232), entre ellos Comas *et al.* (229), consideran que el umbral de cinco SNP utilizado por Wyllie *et al.* (228) y otros autores (113,227,228,233) supone una tasa de sustitución quizás demasiado baja y constante. Lo cual podría desvincular de la transmisión a algunos casos, como consecuencia de un posible acúmulo inusual en el número de SNP debido a diversos factores, tanto del propio microorganismo como del huésped (215,216,230,234). Este hecho se trata en profundidad en el metaanálisis de Hatherell *et al.* (235), donde tras la revisión de veinticinco artículos relacionados con el empleo de datos de WGS para la investigación de la transmisión de la TB, se observa que los umbrales de SNP sugeridos son heterogéneos y dependientes del hallazgo de relaciones epidemiológicas, así como de la metodología empleada en el muestreo, cultivo y análisis bioinformático. Los autores del metaanálisis recomiendan establecer umbrales de SNP específicos para cada estudio, teniendo en cuenta el tiempo entre muestras, la tasa de mutación, la presión evolutiva a la que puede haber estado sometida la cepa y la endemidad de las cepas (235). Lo que indica que todavía queda trabajo por hacer.

4.10 Limitaciones del estudio

- Somos conocedores de las limitaciones de este estudio referidas al tamaño muestral, es por ello por lo que los resultados inferenciales deben ser tomados como específicos de esta muestra y no representativos de toda la población.
- Otra de las limitaciones del estudio fue el análisis retrospectivo de los datos, lo que restó utilidad a la epidemiología molecular. Puesto que esta disciplina permite inferir posibles redes actuales de transmisión de TB, que contrastar con la epidemiología clásica para, posteriormente, adoptar medidas que interrumpan dicha transmisión.

5 CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Se ha detectado un claro predominio de cepas identificadas como *M. tuberculosis* entre los aislados seleccionados en nuestro estudio. No se identificó ningún aislado como *M. africanum*, a pesar de que un 15% de los casos eran originarios del oeste de África.
2. En nuestro caso, la técnica genotípica comercial empleada no pudo detectar el 30% de las cepas resistentes a isoniazida, habiendo sido detectadas mediante secuenciación. Por lo que respecta a la rifampicina, ni la técnica genotípica comercial ni la fenotípica usada fueron capaces de detectar tres casos resistentes, que sí fueron identificados mediante secuenciación, facilitando este método la predicción de las resistencias.
3. La estandarización de la técnica molecular de genotipado MIRU-VNTR de 24 *loci* utilizando una *master mix* comercial premezclada nos permitió agilizar la realización de esta técnica, obteniendo resultados concordantes tanto con la cepa control como con los controles internos empleados, haciendo factible su implementación en nuestro servicio.
4. Los datos obtenidos mediante la técnica MIRU-VNTR de 24 *loci* y analizados mediante la plataforma *on-line* MIRU-VNTR*plus*, nos permitieron conocer la distribución genotípica del complejo *M. tuberculosis* de las cepas estudiadas.
5. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las variables: origen de los casos, forma de presentación de la enfermedad y linaje. Cabe destacar esta última variable, puesto que las cepas pertenecientes al linaje 4.1.2 (Haarlem) predominaron entre los casos agrupados, mientras que entre los casos únicos fueron mayoritarios otros linajes.
6. Al comparar la técnica MIRU-VNTR de 24 *loci* respecto a la de 15 *loci*, estratificando por el umbral establecido, el poder discriminatorio siempre fue superior con la técnica de 24 *loci*.
7. La técnica MIRU-VNTR de 24 *loci* nos ha permitido la asignación de linajes y sub-linajes con una concordancia del 94% respecto a las técnicas de tipado de SNP.
8. Los linajes 4.1.2 (Haarlem), 4.3 (LAM) y 4.10 (PGG3) fueron los más frecuentes en las cepas analizadas, coincidiendo con los más ampliamente distribuidos a nivel mundial. En nuestro estudio, todos los pacientes infectados por cepas de linaje 1 y 3 desarrollaron TB extrapulmonar; mientras que, las cepas de linaje 2 ocasionaron infecciones pulmonares.
9. El *poder discriminatorio* obtenido con la técnica MIRU-VNTR de 24 *loci* aplicada a nuestros casos, tomando como umbral el mismo mirutipo, fue ligeramente superior al obtenido mediante la secuenciación de genoma completo. Sin embargo, el *poder de resolución* de la secuenciación es superior al de la técnica MIRU-VNTR, habiéndonos posibilitado establecer un marco espaciotemporal e inferir el sentido de la transmisión.

Conclusiones

6 BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- (1) World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2018. Geneva: World Health Organization 2018. https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
- (2) Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M, *et al.* Out-of-Africa migration and Neolithic co-expansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nat Genet* 2013 Oct;45(10):1176-1182.
- (3) Brites D, Gagneux S. Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens*. *Immunol Rev* 2015 Mar;264(1):6-24.
- (4) European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2018 – 2016 data. 2018. <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/tuberculosis-surveillance-and-monitoring-europe-2018>
- (5) Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos, III. Informe epidemiológico sobre la situación de la tuberculosis en España. Año 2014. 2015. http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientificos-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/pdf_2015/TB_Informe_2014.pdf
- (6) Servicio de Vigilancia y Control Epidemiológico. Subdirección General de Epidemiología, Vigilancia de la Salud y Sanidad Ambiental. Dirección General de Salud Pública. Informe Tuberculosis Comunitat Valenciana. Vigilancia Epidemiológica. Año 2017. Conselleria de Sanitat Universal i Salut Pública 2018.
- (7) Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW. *Manual of Clinical Microbiology*, 10th ed. American Society of Microbiology; 2011.
- (8) Ghosh J, Larsson P, Singh B, Pettersson BMF, Islam NM, Sarkar SN, *et al.* Sporulation in mycobacteria. *PNAS* 2009;106(26):10781.
- (9) Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock: *Biología de los microorganismos*. 10ª ed. Pearson/Prentice Hall; 2004.
- (10) Alcaide F, Esteban J, González J, Palacios JJ. *Micobacterias*. 9a. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2005.
- (11) Guerrero A, Martín N, Moreno S, Nogales MC, Casal M, Picazo JJ. *Diagnóstico microbiológico de las infecciones por micobacterias*. 9. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 1999.
- (12) Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica*. 5ª ed. Médica Panamericana; 2002.
- (13) Prats G. *Microbiología Clínica*. 1ª ed. Médica Panamericana; 2005.

Bibliografía

- (14) Smith NH, Kremer K, Inwald J, Dale J, Driscoll JR, Gordon SV, *et al.* Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Theor Biol* 2006 Mar 21;239(2):220-225.
- (15) Smith NH, Crawshaw T, Parry J, Birtles RJ. *Mycobacterium microti*: More Diverse than Previously Thought. *J Clin Microbiol* 2009 Aug 1;47(8):2551-2559.
- (16) Wagner JC, Buchanan G, Bokkenheuser V, Levisseur S. An acid-fast bacillus isolated from the lungs of the *Cape hyrax*, *Procavia capensis* (Pallas). *Nature* 1958 Jan 24;181(4604):284-285.
- (17) Mostowy S, Cousins D, Behr MA. Genomic Interrogation of the *Dassie Bacillus* Reveals It as a Unique RD1 Mutant within the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *J Bacteriol* 2004 Jan 1;186(1):104-109.
- (18) Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, *et al.* Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003 Sep;53(Pt 5):1305-1314.
- (19) Bos KI, Harkins KM, Herbig A, Coscolla M, Weber N, Comas I, *et al.* Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. *Nature* 2014 Oct 23;514(7523):494-497.
- (20) Aranaz A, Liébana E, Gómez-Mampaso E, Galán JC, Cousins D, Ortega A, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol* 1999 Jul;49 Pt 3:1263-1273.
- (21) Chiari M, Zanoni M, Alborali LG, Zanardi G, Avisani D, Tagliabue S, *et al.* Isolation of *Mycobacterium caprae* (*Lechtal genotype*) from red deer (*Cervus elaphus*) in Italy. *J Wildl Dis* 2014 Apr;50(2):330-333.
- (22) Jenkins HE, Cox DR, Delahay RJ. Direction of association between bite wounds and *Mycobacterium bovis* infection in Badgers: implications for transmission. *PLoS One* 2012 Sep 1;7(9):e45584.
- (23) Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Domínguez L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz *et al.* 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003 Nov;53(Pt 6):1785-1789.
- (24) Prodinger WM, Brandstätter A, Naumann L, Pacciarini M, Kubica T, Boschirolu ML, *et al.* Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *J Clin Microbiol* 2005 Oct;43(10):4984-4992.
- (25) Grange JM. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis* 2001;81(1-2):71-77.

- (26) Gey van Pittius NC, van Helden PD, Warren RM. Characterization of *Mycobacterium orygis*. *Emerg Infect Dis* 2012 Oct;18(10):1708.
- (27) Van Ingen J, Rahim Z, Mulder A, Boeree MJ, Simeone R, Brosch R, *et al.* Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerg Infect Dis* 2012 Apr;18(4):653-655.
- (28) Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, *et al.* Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis* 2010 Aug;16(8):1296-1299.
- (29) Parsons SDC, Drewe JA, Gey van Pittius NC, Warren RM, van Helden PD. Novel cause of tuberculosis in meerkats, South Africa. *Emerg Infect Dis* 2013 Dec;19(12):2004-2007.
- (30) Coscolla M, Lewin A, Metzger S, Maetz-Renning K, Calvignac-Spencer S, Nitsche A, *et al.* Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex isolate from a wild chimpanzee. *Emerg Infect Dis* 2013 Jun;19(6):969-976.
- (31) Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omaïs B, Marmiesse M, *et al.* Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 2005 Sep;1(1):e5.
- (32) Supply P, Marceau M, Mangenot S, Roche D, Rouanet C, Khanna V, *et al.* Genome analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of the etiologic agent of tuberculosis. *Nat Genet* 2013 Jan 1;45(2).
- (33) Blouin Y, Cazajous G, Dehan C, Soler C, Vong R, Hassan MO, *et al.* Progenitor “*Mycobacterium canettii*” clone responsible for lymph node tuberculosis epidemic, Djibouti. *Emerg Infect Dis* 2014 Jan;20(1):21-28.
- (34) Koeck J, Fabre M, Simon F, Daffé M, Garnotel E, Matan AB, *et al.* Clinical characteristics of the smooth tubercle bacilli '*Mycobacterium canettii*' infection suggest the existence of an environmental reservoir. *Clin Microbiol Infect* 2011 Jul;17(7):1013-1019.
- (35) Van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PE, Hermans PW, Koedam MA, Teppema KS, *et al.* A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol* 1997 Oct;47(4):1236-1245.
- (36) Abramowsky C, Gonzalez B, Sorensen RU. Disseminated bacillus Calmette-Guérin infections in patients with primary immunodeficiencies. *Am J Clin Pathol* 1993 Jul;100(1):52-6.
- (37) Talbot EA, Perkins MD, Silva SF, Frothingham R. Disseminated bacille Calmette-Guérin disease after vaccination: case report and review. *Clin Infect Dis* 1997 Jun;24(6):1139-1146.

Bibliografía

- (38) Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, *et al.* A New Evolutionary Scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. PNAS 2002 Mar 19;99(6):3684-3689.
- (39) Smith NH, Gordon SV, de la Rua-Domenech R, Clifton-Hadley RS, Hewinson RG. Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. Nat Rev Microbiol 2006 Sep;4(9):670-681.
- (40) Comas I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. PLoS One 2009 Nov 1;4(11):e7815.
- (41) Stucki D, Brites D, Jeljeli L, Coscolla M, Liu Q, Trauner A, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* lineage 4 comprises globally distributed and geographically restricted sublineages. Nat Genet 2016 Dec 1;48(12):1535-1543.
- (42) Coll F, McNerney R, Guerra-Assunção JA, Glynn JR, Perdigo J, Viveiros M, *et al.* A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. Nat Commun 2014 Sep 1;5(1):4812.
- (43) Hirsh AE, Tsolaki AG, DeRiemer K, Feldman MW, Small PM. Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. PNAS 2004 Apr 06;101(14):4871-4876.
- (44) Tsolaki AG, Hirsh AE, DeRiemer K, Enciso JA, Wong MZ, Hannan M, *et al.* Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains. PNAS 2004 Apr 06;101(14):4865-4870.
- (45) Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S, *et al.* Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. PNAS 2006 Feb 21;103(8):2869-2873.
- (46) Hershberg R, Lipatov M, Small PM, Sheffer H, Niemann S, Homolka S, *et al.* High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. PLoS Biol 2008 Dec 16;6(12):e311.
- (47) Comas I, Galagan J, Kremer K, Gagneux S, Ernst JD, Chakravarti J, *et al.* Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved. Nat Genet 2010 Jun;42(6):498-503.
- (48) Firdessa R, Berg S, Hailu E, Schelling E, Gumi B, Erenso G, *et al.* Mycobacterial lineages causing pulmonary and extrapulmonary tuberculosis, Ethiopia. Emerg Infect Dis 2013 Mar;19(3):460-463.
- (49) Reed MB, Pichler VK, McIntosh F, Mattia A, Fallow A, Masala S, *et al.* Major *Mycobacterium tuberculosis* lineages associate with patient country of origin. J Clin Microbiol 2009 Apr 1;47(4):1119-1128.

- (50) De Jong BC, Antonio M, Gagneux S. *Mycobacterium africanum* - review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. PLoS Negl Trop Dis 2010 Sep 28;4(9):744.
- (51) Fauci AS, Brauwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, *et al.* Harrison: Principios de Medicina Interna. 17ª ed. México, D.F: McGraw-Hill Interamericana; 2009.
- (52) Manca C, Tsenova L, Barry CE, Bergtold A, Freeman S, Haslett PA, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 induces a more vigorous host response in vivo and in vitro, but is not more virulent than other clinical isolates. J Immunol 1999 Jun 01;162(11):6740-6746.
- (53) Manca C, Reed MB, Freeman S, Mathema B, Kreiswirth B, Barry CE, *et al.* Differential monocyte activation underlies strain-specific *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. Infect Immun 2004 Sep;72(9):5511-5514.
- (54) Mensa J. Guía de Terapéutica Antimicrobiana 2018. 18th ed. ANTARES-MENSA; 2018.
- (55) Van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Rev 2002 Apr;15(2):294-309.
- (56) North RJ, Jung Y. Immunity to tuberculosis. Annu Rev Immunol 2004;22:599-623.
- (57) Houben ENG, Nguyen L, Pieters J. Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system. Curr Opin Microbiol 2006 Feb;9(1):76-85.
- (58) Van Kooyk Y, Geijtenbeek TBH. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. Nat Rev Immunol 2003 Sep;3(9):697-709.
- (59) Ting LM, Kim AC, Cattamanchi A, Ernst JD. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits IFN-gamma transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. J Immunol 1999 Oct 01;163(7):3898-3906.
- (60) Seah GT, Scott GM, Rook GA. Type 2 cytokine gene activation and its relationship to extent of disease in patients with tuberculosis. J Infect Dis 2000 Jan;181(1):385-389.
- (61) Van Crevel R, Karyadi E, Preyers F, Leenders M, Kullberg BJ, Nelwan RH, *et al.* Increased production of interleukin 4 by CD4+ and CD8+ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. J Infect Dis 2000 Mar;181(3):1194-1197.
- (62) Fortune SM, Solache A, Jaeger A, Hill PJ, Belisle JT, Bloom BR, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* inhibits macrophage responses to IFN-gamma through myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent mechanisms. J Immunol 2004 May 15;172(10):6272-6280.
- (63) Noss EH, Pai RK, Sellati TJ, Radolf JD, Belisle J, Golenbock DT, *et al.* Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC

Bibliografía

expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol 2001 Jul 15;167(2):910-918.

(64) Gagneux S, Small PM. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. Lancet Infect Dis 2007;7(5):328-337.

(65) Manca C, Tsenova L, Bergtold A, Freeman S, Tovey M, Musser JM, *et al.* Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN- α / β . PNAS 2001 May 08;98(10):5752-5757.

(66) Coscolla M, Gagneux S. Does *M. tuberculosis* genomic diversity explain disease diversity? Drug Discov Today Dis Mech 2010;7(1):e59.

(67) Coscolla M, Sebastien. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. Semin Immunol 2014;26(6):431-444.

(68) Moreno-Pérez D, Baquero-Artigao F, González R, Altet N, Mellado M, Gómez-Pastrana D, *et al.* Diagnóstico de la tuberculosis en la edad pediátrica. An Pediatr 2010;72(72):283.

(69) Allen S, Batungwanayo J, Kerlikowske K, Lifson AR, Wolf W, Granich R, *et al.* Two-year incidence of tuberculosis in cohorts of HIV-infected and uninfected urban Rwandan women. Am Rev Respir Dis 1992 Dec;146(6):1439-1444.

(70) Hopewell PC. Overview of Clinical Tuberculosis. Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control: American Society of Microbiology; 1994. p. 25-46.

(71) González-Martín J, García-García JM, Anibarro L, Vidal R, Esteban J, Blanquer R, *et al.* Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. Enferm Infecc Microbiol Clin 2010;28(5):297.e20.

(72) Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. Am J Respir Crit Care Med 2000 Apr;161(4 Pt 1):1376-1395.

(73) ECDC. Handbook on TB laboratory diagnostic methods in the European Union. Wien: IAEA; 2016. <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/handbook-tuberculosis-laboratory-diagnostic-methods-european-union-updated-2018>

(74) Abe C, Hirano K, Tomiyama T. Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 1999 Nov;37(11):3693-3697.

- (75) Hillemann D, Rüscher-Gerdes S, Richter E. Application of the Capilia TB assay for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005 Dec;9(12):1409-1411.
- (76) Yu M, Chen H, Wu M, Huang W, Kuo Y, Yu F, *et al.* Evaluation of the Rapid MGIT TBc identification test for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex strain detection. *J Clin Microbiol* 2011 Mar 1;49(3):802-807.
- (77) Stinson KW, Eisenach K, Kayes S, Matsumoto M, Siddiqi S, Nakashima S, *et al.* *Mycobacteriology Laboratory Manual*. Global Laboratory Initiative a Working Group of the Stop TB Partnership 2014. http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/gli_mycobacteriology_lab_manual_web.pdf
- (78) Hirano K, Aono A, Takahashi M, Abe C. Mutations including IS6110 insertion in the gene encoding the MPB64 protein of Capilia TB-Negative *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* 2004 Jan 1;42(1):390-392.
- (79) Alcaide F, Palop-Borrás B, Domingo D, Tudó G. Application of mass spectrometry in mycobacteria. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016 Jun;34 Suppl 2:31-35.
- (80) Alcaide F. Diagnóstico microbiológico actual de la tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2017;35(7):399-402.
- (81) Chakravorty S, Simmons AM, Rowneki M, Parmar H, Cao Y, Ryan J, *et al.* The New Xpert MTB/RIF Ultra: Improving Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Resistance to Rifampin in an Assay Suitable for Point-of-Care Testing. *MBio* 2017 Sep 6;8(4):e00812.
- (82) Vinuesa V, Navarro D, Poujois S, Zaragoza S, Borrás R. Performance characteristics of the new Abbott Real Time MTB assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016 Mar;84(3):212-214.
- (83) Babafemi EO, Cherian BP, Banting L, Mills GA, Ngianga K 2nd. Effectiveness of real-time polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pathological samples: a systematic review and meta-analysis. *Syst Rev* 2017 Oct 25;6(1):215-16.
- (84) World Health Organization. Stop TB Partnership. The Stop TB Strategy. Geneva: World Health Organization 2006. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69241/WHO_HTM_STB_2006.368_eng.pdf
- (85) Lee E, Holzman RS. Evolution and current use of the tuberculin test. *Clin Infect Dis* 2002 Feb 01;34(3):365-370.
- (86) Santin M, García-García J, Rigau D, Altet N, Anibarro L, Casas I, *et al.* Sumario ejecutivo de la guía de práctica clínica sobre el uso de las pruebas de

Bibliografía

liberación de interferón-gamma para el diagnóstico de infección tuberculosa. Arch Bronconeumol 2016 /09/01;52(9):477-481.

(87) Denkinger CM, Dheda K, Pai M. Guidelines on interferon- γ release assays for tuberculosis infection: concordance, discordance or confusion? Clin Microbiol Infect 2011 Jun;17(6):806-814.

(88) Pai M, Denkinger CM, Kik SV, Rangaka MX, Zwerling A, Oxlade O, *et al.* Gamma interferon release assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Clin Microbiol Rev 2014 Jan;27(1):3-20.

(89) Expert Group Meeting Report. Use of interferon- γ release assays (IGRAs) in tuberculosis control in low- and middle-income settings. World Health Organization 2010. <https://www.who.int/tb/publications/tb-igraexpertmeeting-report/en/>

(90) World Health Organization. Guidelines for intensified tuberculosis case-finding and isoniazid preventive therapy for people living with HIV in resource-constrained settings. World Health Organization 2011. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44472/9789241500708_eng.pdf?sequence=1

(91) European Center for Disease Prevention and Control. Use of interferon-gamma release assays in support of TB diagnosis. European Center for Disease Prevention and Control 2011. https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/1103_GUI_IGRA.pdf

(92) World Health Organization. Guidelines on the management of latent tuberculosis infection. World Health Organization 2015. <https://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21682en/s21682en.pdf>

(93) Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis 2009 Nov;13(11):1320-1330.

(94) Canetti G, Rist N, Grosset JM. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. Méthodologie, critères de résistance, résultats, interprétation. Rev Tuberc Pneumol 1963;27:172-217.

(95) Alcaide F, Esteban J, González J, Palacios JJ. Métodos de determinación de sensibilidad a los antimicrobianos en micobacterias. 56. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2016.

(96) Blumberg HM, Burman WJ, Chaisson RE, Daley CL, Etkind SC, Friedman LN, *et al.* American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: treatment of tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 2003 Feb 15;167(4):603-662.

- (97) Clinical and Laboratory Standards Institute, (CLSI). Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and Other Aerobic Actinomycetes. M24Ed3. CLSI 2018.
- (98) Joloba ML, Bajaksouzian S, Jacobs MR. Evaluation of Etest for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2000 Oct;38(10):3834-3836.
- (99) Alcaide F, Esteban J, González-Martín J, Palacios JJ. Métodos de determinación de sensibilidad a los antimicrobianos en micobacterias. Enferm Infecc Microbiol Clin 2017;35(35):529-535.
- (100) UNITAID. Tuberculosis. Diagnostics Technology and Market Landscape. PR Newswire 2015. https://www.researchgate.net/publication/282878590_UNITAID_Tuberculosis_diagnostics_technology_and_market_landscape_4th_edition_2015pdf
- (101) Coll F, McNerney R, Preston MD, Guerra-Assunção JA, Warry A, Hill-Cawthorne G, *et al*. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. Genome Med 2015;7(1):51.
- (102) Khan MT, Rehaman AU, Junaid M, Malik SI, Wei D. Insight into novel clinical mutants of RpsA-S324F, E325K, and G341R of *Mycobacterium tuberculosis* associated with pyrazinamide resistance. Comput Struct Biotechnol J 2018;16:379-387.
- (103) Lee J, Armstrong DT, Ssengooba W, Park J, Yu Y, Mumbowa F, *et al*. Sensititre MYCOTB MIC plate for testing *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility to first- and second-line drugs. Antimicrob Agents Chemother 2014;58(1):11-18.
- (104) Heysell SK, Pholwat S, Mpagama SG, Pazia SJ, Kumburu H, Ndusilo N, *et al*. Sensititre MycoTB plate compared to Bactec MGIT 960 for first- and second-line antituberculosis drug susceptibility testing in Tanzania: a call to operationalize MICs. Antimicrob Agents Chemother 2015 Nov;59(11):7104-7108.
- (105) Yu X, Ma YF, Jiang GL, Chen ST, Wang GR, Huang HR. Sensititre® MYCOTB MIC plate for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. Int J Tuberc Lung Dis 2016 Mar;20(3):329-334.
- (106) Zhang Y, Yew W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015. Int J Tuberc Lung Dis 2015 Nov;19(11):1276-1289.
- (107) UNITAID. Tuberculosis. Diagnostics Technology Landscape. World Health Organization 2017. <http://unitaid.org/assets/2017-Unitaid-TB-Diagnostics-Technology-Landscape.pdf>
- (108) Walker TM, Kohl TA, Omar SV, Hedge J, Del Ojo Elias C, Bradley P, *et al*. Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study. Lancet Infect Dis 2015;15(10):1193-1202.

Bibliografía

- (109) Feuerriegel S, Schleusener V, Beckert P, Kohl TA, Miotto P, Cirillo DM, *et al.* PhyResSE: a Web Tool Delineating *Mycobacterium tuberculosis* Antibiotic Resistance and Lineage from Whole-Genome Sequencing Data. *J Clin Microbiol* 2015 Jun;53(6):1908-1914.
- (110) Miotto P, Tessema B, Tagliani E, Chindelevitch L, Starks AM, Emerson C, *et al.* A standardised method for interpreting the association between mutations and phenotypic drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur Respir J* 2017 Dec;50(6).
- (111) The CRyPTIC Consortium and the 100,000 Genomes Project. Prediction of Susceptibility to First-Line Tuberculosis Drugs by DNA Sequencing. *N Engl J Med* 2018 Sep 26;379(15):1403-1415.
- (112) Bryant JM, Schurch AC, Deutekom Hv, Harris SR, de Beer JL, Jager Vd, *et al.* Inferring patient to patient transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from whole genome sequencing data. *BMC Infect Dis* 2013;13:110.
- (113) Roetzer A, Diel R, Kohl TA, Rückert C, Nübel U, Blom J, *et al.* Whole genome sequencing *versus* traditional genotyping for investigation of a *Mycobacterium tuberculosis* outbreak: a longitudinal molecular epidemiological study. *PLoS Med* 2013;10(2):e1001387.
- (114) Lee RS, Behr MA. The implications of whole-genome sequencing in the control of tuberculosis. *Ther Adv Infect Dis* 2016 Apr;3(2):47-62.
- (115) Gurjav U, Outhred AC, Jelfs P, McCallum N, Wang Q, Hill-Cawthorne GA, *et al.* Whole Genome Sequencing Demonstrates Limited Transmission within Identified *Mycobacterium tuberculosis* Clusters in New South Wales, Australia. *PLoS One* 2016 Oct 1;11(10):e0163612.
- (116) Fox W, Ellard GA, Mitchison DA. Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946-1986, with relevant subsequent publications. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999 Oct;3(10 Suppl 2):231.
- (117) Caminero JA, Van Deun A, Fujiwara PI, Monedero I, Chiang CY, Rieder HL. Guidelines for clinical and operational management of drug-resistant tuberculosis. 2013. https://www.theunion.org/what-we-do/publications/technical/english/mdr-tbguide_6-19-13_web.pdf
- (118) Caminero JA, Cayla JA, García-García J, García-Pérez FJ, Palacios JJ, Ruiz-Manzano J. Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis con resistencia a fármacos. *Arch Bronconeumol* 2017 /09/01;53(9):501-509.
- (119) Global Alliance for TB Drug Development (TB Alliance). Handbook of anti-tuberculosis agents. Tuberculosis (Edinburgh, Scotland) 2008 Mar;88(2):85-170.

- (120) World Health Organization. Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care, 2017 update. 2017. https://www.who.int/tb/publications/2017/dstb_guidance_2017/en/
- (121) Caminero JA, Sotgiu G, Zumla A, Migliori GB. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2010 /09/01;10(9):621-629.
- (122) World Health Organization. WHO treatment guidelines for multidrug- and rifampicin-resistant tuberculosis, 2018 update. [Pre-final text]. 2019. <https://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/guideline-update2018/en/>
- (123) Panel de expertos de Gesida y Plan Nacional sobre el SIDA. Documento de consenso de GESIDA/ Plan Nacional sobre el SIDA respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (actualización enero 2019). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2019;29(3):209.e103.
- (124) Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. IDSA. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 Apr;161(4 Pt 2):221.
- (125) Grupo de trabajo del área TIR de SEPAR Recomendaciones SEPAR. Normativa sobre la prevención de la tuberculosis. *Arch Bronconeumol* 2002 Sep;38(9):441-451.
- (126) Centers for Diseases Control and Prevention. Guidelines for the investigation of contacts of persons with infectious tuberculosis; recommendations from the national Tuberculosis Controllers Association and CDC, and Guidelines for using QuantiFERON®-TB Gold test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection. 2005;54:55. <https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr5415.pdf>
- (127) World Health Organization. Latent tuberculosis infection. Updated and consolidated guidelines for programmatic management. 2018. <https://www.who.int/tb/publications/2018/latent-tuberculosis-infection/en/>
- (128) Servicio de Vigilancia y Control Epidemiológico. Protocolo Tuberculosis. 2012. Dirección General de Investigación y Salud Pública. Agencia Valenciana de Salud.
- (129) Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Gobierno de España. Plan para la Prevención y Control de la Tuberculosis en España. 2016(3). <https://www.mschs.gob.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/PlanTuberculosis/docs/planTuberculosis.pdf>
- (130) Coll P, García de Viedma D. Epidemiología molecular de la tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2018;36(4):233-240.

Bibliografía

- (131) Hirsh AE, Tsolaki AG, DeRiemer K, Feldman MW, Small PM. Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. PNAS 2004 Apr 6;101(14):4871-6.
- (132) Comas I, Gagneux S. The past and future of tuberculosis research. PLoS Pathog 2009 Oct;5(10):e1000600.
- (133) Martínez M, García de Viedma D, Alonso M, Andrés S, Bouza E, Cabezas T, *et al.* Impact of laboratory cross-contamination on molecular epidemiology studies of tuberculosis. J Clin Microbiol 2006 Aug;44(8):2967-2969.
- (134) Martín A, Herranz M, Lirola MM, Fernández RF, Bouza E, García de Viedma D. Optimized molecular resolution of cross-contamination alerts in clinical mycobacteriology laboratories. BMC Microbiol 2008 Feb 14;8:30.
- (135) Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, *et al.* The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. N Engl J Med 1994 Jun 16;330(24):1703-1709.
- (136) Barnes PF, Cave MD. Molecular Epidemiology of Tuberculosis. N Engl J Med 2003 Sep 18;349(12):1149-1156.
- (137) Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PWM, C. Martín, *et al.* Comparison of Methods Based on Different Molecular Epidemiological Markers for Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains: Interlaboratory Study of Discriminatory Power and Reproducibility. J Clin Microbiol 1999 Aug 1;37(8):2607-2618.
- (138) Van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. J Intern Med 2001 Jan;249(1):1-26.
- (139) Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, *et al.* Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol. 1993 Feb; 31(2): 406–409.
- (140) Warren RM, van der Spuy GD., Richardson M, Beyers N, Borgdorff MW, Behr MA, *et al.* Calculation of the stability of the IS6110 banding pattern in patients with persistent *Mycobacterium tuberculosis* disease. J Clin Microbiol 2002 May;40(5):1705-1708.
- (141) Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, *et al.* Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 1997 Apr 1;35(4):907-914.
- (142) Cafrune PI, Possuelo LG, Ribeiro AW, Ribeiro MO, Unis G, Jarczewski CA, *et al.* Prospective study applying spoligotyping directly to DNA from

sputum samples of patients suspected of having tuberculosis. *Can J Microbiol* 2009 July 1;55(7):895-900.

(143) Kremer K, Arnold C, Cataldi A, Gutiérrez MC, Haas WH, Panaiotov S, *et al.* Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microbiol* 2005 Nov;43(11):5628-5638.

(144) Van der Zanden A, Kremer K, Schouls LM, Caimi K, Cataldi A, Hulleman A, *et al.* Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. *J Clin Microbiol* 2002 Dec;40(12):4628-4639.

(145) Cox R, Mirkin SM. Characteristic Enrichment of DNA Repeats in Different Genomes. *PNAS* 1997 May 13;94(10):5237-5242.

(146) Sharples GJ, Lloyd RG. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Res* 1990 Nov 25;18(22):6503-6508.

(147) Lindstedt B. Multiple-*locus* variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* 2005 Jun;26(13):2567-2582.

(148) Supply P, Magdalena J, Himpens S, Locht C. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Mol Microbiol* 1997 Dec;26(5):991-1003.

(149) Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* 2000 May;36(3):762-771.

(150) Roring S, Scott AN, Glyn Hewinson R, Neill SD, Skuce RA. Evaluation of variable number tandem repeat (VNTR) loci in molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Ireland. *Vet Microbiol* 2004 Jun 10;101(1):65-73.

(151) Savine E, Warren RM, van der Spuy GD, Beyers N, van Helden PD, Locht C, *et al.* Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002 Dec;40(12):4561-4566.

(152) Smittipat N, Billamas P, Palittapongarnpim M, Thong-On A, Temu MM, Thanakijcharoen P, *et al.* Polymorphism of Variable-Number Tandem Repeats at Multiple *Loci* in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2005 Oct 1;43(10):5034-5043.

(153) Jagielski T, Minias A, van Ingen J, Rastogi N, Brzostek A, Żaczek A, *et al.* Methodological and Clinical Aspects of the Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and Other Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2016 Apr;29(2):239-290.

Bibliografía

- (154) Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, *et al.* Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006 Dec 1;44(12):4498-4510.
- (155) Mokrousov I. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and mycobacterial interspersed repetitive unit typing. *J Clin Microbiol* 2006 Apr;44(4):1615.
- (156) Hanekom M, van der Spuy GD, Streicher E, Ndabambi SL, McEvoy CRE, Kidd M, *et al.* A Recently Evolved Sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strain Family Is Associated with an Increased Ability to Spread and Cause Disease. *J Clin Microbiol* 2007 May 1;45(5):1483-1490.
- (157) Allix-Béguec C, Wahl C, Hanekom M, Nikolayevskyy V, Drobniewski F, Maeda S, *et al.* Proposal of a Consensus Set of Hypervariable Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat *Loci* for Subtyping of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Isolates. *J Clin Microbiol* 2014 Jan 1;52(1):164-172.
- (158) Niemann S, Köser CU, Gagneux S, Plinke C, Homolka S, Bignell H, *et al.* Genomic Diversity among Drug Sensitive and Multidrug Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with Identical DNA Fingerprints. *PLoS One* 2009 Oct 1;4(10):e7407.
- (159) Ford CB, Lin PL, Chase MR, Shah RR, Iartchouk O, Galagan J, *et al.* Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection. *Nat Genet* 2011 May;43(5):482-486.
- (160) Walker TM, Ip C, Harrell RH, Evans JT, Kapatai G, Dedicoat MJ, *et al.* Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. *Lancet Infect Dis* 2013;13(2):137-146.
- (161) Gardy JL, Johnston JC, Sui SJH, Cook VJ, Shah L, Brodtkin E, *et al.* Whole-Genome Sequencing and Social-Network Analysis of a Tuberculosis Outbreak. *N Engl J Med* 2011 Feb 24;364(8):730-739.
- (162) Sandgren A, Strong M, Muthukrishnan P, Weiner BK, Church GM, Murray MB. Tuberculosis Drug Resistance Mutation Database. *PLoS Med* 2009 Feb 1;6(2).
- (163) Merker M, Kohl TA, Roetzer A, Truebe L, Richter E, Rüsch-Gerdes S, *et al.* Whole Genome Sequencing Reveals Complex Evolution Patterns of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strains in Patients. *PLoS One* 2013 Dec 1;8(12):e82551.
- (164) Köser CU, Bryant JM, Becq J, Török ME, Ellington MJ, Marti-Renom MA, *et al.* Whole-genome sequencing for rapid susceptibility testing of *M. tuberculosis*. *N Engl J Med* 2013 Jul 18;369(3):290-292.

- (165) Informe de Tuberculosis en la Comunidad Valenciana. Año 2015. Dirección General de Salud Pública. Área de Epidemiología. Servicio de Vigilancia y Control Epidemiológico. Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat. 2016.
- (166) Esteban J. Bioseguridad en el laboratorio de micobacterias. Control de Calidad SEIMC.
<https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micobacterias/Segubk.pdf>
- (167) Hernández A, Luna Mendaza P. NTP 233: Cabinas de seguridad biológica. Centro Nacional de Condiciones del Trabajo.
https://www.insst.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/201a300/ntp_233.pdf
- (168) Van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, Soll DR, van Embden JD. Occurrence and Stability of Insertion Sequences in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains: Evaluation of an Insertion Sequence-Dependent DNA Polymorphism as a Tool in the Epidemiology of Tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1991;29.
- (169) Richter E, Weizenegger M, Rüscher-Gerdes S, Niemann S. Evaluation of Genotype MTBC Assay for Differentiation of Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates. *J Clin Microbiol* 2003 Jun 1;41(6):2672-2675.
- (170) Somoskovi A, Dormandy J, Rivenburg J, Pedrosa M, McBride M, Salfinger M. Direct Comparison of the GenoType MTBC and Genomic Deletion Assays in Terms of Ability To Distinguish between Members of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Clinical Isolates and in Clinical Specimens. *J Clin Microbiol* 2008 May 1;46(5):1854-1857.
- (171) GenoType MTBDRplus. HAIN Lifescience 2015 Jul. VER 2.0.
- (172) Andre E, Goeminne L, Cabibbe A, Beckert P, Kabamba Mukadi B, Mathys V, *et al.* Consensus numbering system for the rifampicin resistance-associated *rpoB* gene mutations in pathogenic mycobacteria. *Clin Microbiol Infect* 2017 Mar;23(3):167-172.
- (173) Satta G, Atzeni A, McHugh TD. *Mycobacterium tuberculosis* and whole genome sequencing: a practical guide and online tools available for the clinical microbiologist. *Clin Microbiol Infect* 2017 Feb;23(2):69-72.
- (174) Comas I, Borrell S, Roetzer A, Rose G, Malla B, Kato-Maeda M, *et al.* Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes. *Nat Genet* 2012 Jan 1;44(1):106-110.
- (175) Supply P. Multilocus variable number tandem repeat genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. Technical Guide 2005. <https://www.miru-vntrplus.org/MIRU/files/MIRU-VNTRtypingmanualv6.pdf>

Bibliografía

- (176) De Beer JL, Akkerman OW, Schurch AC, Mulder A, van der Werf TS, van der Zanden AGM, *et al.* Optimization of standard in-house 24-locus variable-number tandem-repeat typing for *Mycobacterium tuberculosis* and its direct application to clinical material. *J Clin Microbiol* 2014;52(5):1338-1342.
- (177) MIRU-VNTRplus. MIRU-VNTRplus Help. 2008 Sep;1.0.8.
- (178) Allix-Béguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S. 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. *J Clin Microbiol* 2008 Aug 1;46(8):2692-2699.
- (179) Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harmsen D. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic Acids Res* 2010 Jul 1;38(Web Server issue):W326–W331.
- (180) Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C. Automated High-Throughput Genotyping for Study of Global Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* Based on Mycobacterial Interspersed Repetitive Units. *J Clin Microbiol* 2001;39(10):3563-3571.
- (181) Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, *et al.* Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006;44(12):4498-4510.
- (182) Nei M, Tajima F, Tatenno Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *J Mol Evol* 1983;19(2):153-170.
- (183) Takezaki N, Nei M. Empirical Tests of the Reliability of Phylogenetic Trees Constructed With Microsatellite DNA. *Genetics* 2008 Jan 1;178(1):385-392.
- (184) Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res* 2016 Jul 8;44(W1):W245.
- (185) Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 1988 Nov 1;26(11):2465-2466.
- (186) Stucki D, Malla B, Hostettler S, Huna T, Feldmann J, Yeboah-Manu D, *et al.* Two New Rapid SNP-Typing Methods for Classifying *Mycobacterium tuberculosis* Complex into the Main Phylogenetic Lineages. *PLoS One* 2012 Jul 1;7(7):e41253.
- (187) Niemann S, Supply P. Diversity and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*: moving to whole-genome-based approaches. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014 Sep 4;4(12):a021188.

- (188) Comas I, Hailu E, Kiros T, Bekele S, Mekonnen W, Gumi B, *et al.* Population Genomics of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia Contradicts the Virgin Soil Hypothesis for Human Tuberculosis in Sub-Saharan Africa. *Curr Biol* 2015 Dec 21;25(24):3260-3266.
- (189) Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* 2014 Aug 1;30(15):2114-2120.
- (190) Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2009 Jul 15;25(14):1754-1760.
- (191) Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics* 2011 Nov 1;27(21):2987-2993.
- (192) Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, *et al.* VarScan 2: Somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res* 2012 Mar;22(3):568-576.
- (193) Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen T, Wang L, *et al.* A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff. *Fly* 2012 Apr 1;6(2):80.
- (194) BD MGIT™ TBc Identification Test. Insert 2016.
- (195) Ritz N, Tebruegge M, Connell TG, Sievers A, Robins-Browne R, Curtis N. Susceptibility of *Mycobacterium bovis* BCG Vaccine Strains to Antituberculous Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 Jan 1;53(1):316-318.
- (196) Watts MR, Taylor PC, Sintchenko V, Whelan CM, Farnsworth RH, Jones P, *et al.* Implications of Isoniazid Resistance in *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin used for Immunotherapy in Bladder Cancer. *Clin Infect Dis* 2011 Jan 1;52(1):86-88.
- (197) Kolibab K, Derrick SC, Morris SL. Sensitivity to Isoniazid of *Mycobacterium bovis* BCG Strains and BCG Disseminated Disease Isolates. *J Clin Microbiol* 2011 Jun;49(6):2380-2381.
- (198) Fontalvo D, Gómez D. Genes del *Mycobacterium tuberculosis* involucrados en la patogenicidad y resistencia a antibióticos durante la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. *Medicas UIS* 2015 Apr 1;28(1):39-51.
- (199) Viñuelas-Bayón J, Vitoria MA, Samper S. Diagnóstico rápido de la tuberculosis. Detección de mecanismos de resistencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2017;35(8):520-528.
- (200) Lanzas F, Ioerger TR, Shah H, Acosta W, Karakousis PC. First Evaluation of GenoType MTBDR_{plus} 2.0 Performed Directly on Respiratory Specimens in Central America. *J Clin Microbiol* 2016 Oct;54(10):2498.

Bibliografía

- (201) Alonso M, Palacios JJ, Herranz M, Penedo A, Menéndez Á, Bouza E, *et al.* Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* Strains with a Silent Mutation in *rpoB* Leading to Potential Misassignment of Resistance Category. *J Clin Microbiol* 2011 Jul 1;49(7):2688.
- (202) Behr MA, Schroeder BG, Brinkman JN, Slayden RA, Barry III CE. A Point Mutation in the *mma3* Gene Is Responsible for Impaired Methoxymycolic Acid Production in *Mycobacterium bovis* BCG Strains Obtained after 1927. *J Bacteriol* 2000 Jun 15;182(12):3394-3399.
- (203) Siu GKH, Zhang Y, Lau TCK, Lau RWT, Ho P, Yew W, *et al.* Mutations outside the rifampicin resistance-determining region associated with rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2011 Apr 1;66(4):730-733.
- (204) Sanchez-Padilla E, Merker M, Beckert P, Jochims F, Dlamini T, Kahn P, *et al.* Detection of drug-resistant tuberculosis by Xpert MTB/RIF in Swaziland. *N Engl J Med* 2015 Mar 19;372(12):1181-1182.
- (205) Rigouts L, Gumusboga M, Bram de Rijk W, Nduwamahoro E, Uwizeye C, de Jong B, *et al.* Rifampin Resistance Missed in Automated Liquid Culture System for *Mycobacterium tuberculosis* Isolates with Specific *rpoB* Mutations. *J Clin Microbiol* 2013 Aug 1;51(8):2641.
- (206) Miotto P, Cabibbe AM, Borroni E, Degano M, Cirillo DM. Role of Disputed Mutations in the *rpoB* Gene in Interpretation of Automated Liquid MGIT Culture Results for Rifampin Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2018 Mar 14;56(5). pii: e01599-17.
- (207) Shi W, Zhang X, Jiang X, Ruan H, Barry CE, Wang H, *et al.* Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*: a potential mechanism for shortening the duration of tuberculosis chemotherapy. *Science* 2011 Sep 16;333(6049):1630-2.
- (208) Tan Y, Hu Z, Zhang T, Cai X, Kuang H, Liu Y, *et al.* Role of *pncA* and *rpsA* Gene Sequencing in Detection of Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Southern China. *J Clin Microbiol* 2014 Jan 1;52(1):291-297.
- (209) Fenner L, Egger M, Bodmer T, Furrer H, Ballif M, Battegay M, *et al.* HIV infection disrupts the sympatric host-pathogen relationship in human tuberculosis. *PLoS Genet* 2013;9(3):e1003318.
- (210) Click ES, Moonan PK, Winston CA, Cowan LS, Oeltmann JE. Relationship Between *Mycobacterium tuberculosis* Phylogenetic Lineage and Clinical Site of Tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2012 Jan 15;54(2):211-219.
- (211) Kong Y, Cave MD, Zhang L, Foxman B, Marrs CF, Bates JH, *et al.* 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. *J Clin Microbiol* 2007 Feb 1;45(2):409-414.
- (212) Kong Y, Cave MD, Zhang L, Foxman B, Marrs CF, Bates JH, *et al.* Population-Based Study of Deletions in Five Different Genomic Regions of *Mycobacterium tuberculosis* and Possible Clinical Relevance of the Deletions. *J Clin Microbiol* 2006 Nov 1;44(11):3940-3946.
- (213) Pareek M, Evans J, Innes J, Smith G, Hingley-Wilson S, Loughheed KE, *et al.* Ethnicity and mycobacterial lineage as determinants of tuberculosis disease phenotype. *Thorax* 2013 Mar;68(3):221-229.
- (214) Rieder HL. Bases epidemiológicas del control de la tuberculosis. Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias 1999. https://tbrieder.org/publications/books_spanish/epidemiology_sp.pdf
- (215) Pérez-Lago L, Comas I, Navarro Y, González-Candelas F, Herranz M, Bouza E, *et al.* Whole genome sequencing analysis of inpatient microevolution in *Mycobacterium tuberculosis*: potential impact on the inference of tuberculosis transmission. *J Infect Dis* 2014 Jan 1;209(1):98-108.
- (216) Pérez-Lago L, Rodríguez AI, Comas I, Herranz M, Ruiz-Serrano MJ, Bouza E, *et al.* Subtle genotypic changes can be observed soon after diagnosis in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Int J Med Microbiol* 2016;306(6):401-405.
- (217) Sarkar M, Srinivasa, Madabhavi I, Kumar K. Tuberculosis associated chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Respir J* 2017 May;11(3):285-295.
- (218) Lee C, Lee M, Shu C, Lim C, Wang J, Lee L, *et al.* Risk factors for pulmonary tuberculosis in patients with chronic obstructive airway disease in Taiwan: a nationwide cohort study. *BMC Infect Dis* 2013 Jan 1;13(1):194.
- (219) Inghammar M, Ekbom A, Engstrom G, Ljungberg B, Romanus V, Lofdahl C, *et al.* COPD and the risk of tuberculosis--a population-based cohort study. *PloS One* 2010;5(4):e10138.
- (220) Kim J, Park J, Kim K, Jeong H, Kim E, Lee J. Inhaled Corticosteroid Is Associated With an Increased Risk of TB in Patients With COPD. *Chest* 2013 Apr;143(4):1018-1024.
- (221) Djelouadji Z, Orehek J, Drancourt M. Rapid detection of laboratory cross-contamination with *Mycobacterium tuberculosis* using multispacer sequence typing. *BMC Microbiol* 2009 Mar 3;9(1):47.
- (222) National TB Controllers Association / CDC Advisory Group on Tuberculosis Genotyping. Guide to the Application of Genotyping to Tuberculosis Prevention and Control. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC 2004. https://www.cdc.gov/tb/programs/genotyping/images/TBGenotypingGuide_June2004.pdf

Bibliografía

(223) Centers for Disease Control and Prevention, (CDC). Prioritizing Tuberculosis Genotype Clusters for Further Investigation and Public Health Action. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC 2017.

https://www.cdc.gov/tb/programs/genotyping/Prioritizing_Tuberculosis_Genotype_Clusters_August2017.pdf

(224) Glynn JR, Yates MD, Crampin AC, Ngwira BM, Mwaungulu FD, Black GF, *et al.* DNA Fingerprint Changes in Tuberculosis: Reinfection, Evolution, or Laboratory Error? *J Infect Dis* 2004 Sep 15;190(6):1158-1166.

(225) Al-Hajoj SAM, Akkerman O, Parwati I, al-Gamdi S, Rahim Z, van Soolingen D, *et al.* Microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a Tuberculosis Patient. *J Clin Microbiol* 2010 Oct 1;48(10):3813-3816.

(226) Navarro Y, Herranz M, Pérez-Lago L, Martínez M, Ruiz-Serrano MJ, Bouza E, *et al.* Systematic Survey of Clonal Complexity in Tuberculosis at a Populational Level and Detailed Characterization of the Isolates Involved. *J Clin Microbiol* 2011 Dec 1;49(12):4131-4137.

(227) Walker TM, Monk P, Grace Smith E, Peto TEA. Contact investigations for outbreaks of *Mycobacterium tuberculosis*: advances through whole genome sequencing. *Clin Microbiol Infect* 2013 Sep;19(9):796-802.

(228) Wyllie DH, Davidson JA, Smith EG, Rathod P, Crook DW, Peto TEA, *et al.* A Quantitative Evaluation of MIRU-VNTR Typing Against Whole-Genome Sequencing for Identifying *Mycobacterium tuberculosis* Transmission: A Prospective Observational Cohort Study. *EBioMedicine* 2018 Aug;34:122-130.

(229) Comas I, Gardy JL. TB Transmission: Closing the Gaps. *EBioMedicine* 2018 Aug;34:4-5.

(230) Kato-Maeda M, Ho C, Passarelli B, Banaei N, Grinsdale J, Flores L, *et al.* Use of whole genome sequencing to determine the microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* during an outbreak. *PLoS One* 2013 Mar 1;8(3):58235.

(231) Walker TM, Lalor MK, Broda A, Ortega LS, Morgan M, Parker L, *et al.* Assessment of *Mycobacterium tuberculosis* transmission in Oxfordshire, UK, 2007-12, with whole pathogen genome sequences: an observational study. *Lancet Respir Med* 2014;2(4):285-292.

(232) Stucki D, Ballif M, Bodmer T, Coscolla M, Maurer A, Droz S, *et al.* Tracking a tuberculosis outbreak over 21 years: strain-specific single-nucleotide polymorphism typing combined with targeted whole-genome sequencing. *J Infect Dis* 2015 Apr 15;211(8):1306-1316.

(233) Lee RS, Radomski N, Proulx J, Manry J, McIntosh F, Desjardins F, *et al.* Reemergence and amplification of tuberculosis in the Canadian arctic. *J Infect Dis* 2015 Jun 15;211(12):1905-1914.

- (234) Schürch AC, Kremer K, Kiers A, Daviena O, Boeree MJ, Siezen RJ, *et al.* The *tempo* and *mode* of molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis* at patient-to-patient scale. *Infect Genet Evol* 2010;10(1):108-114.
- (235) Hatherell H, Colijn C, Stagg HR, Jackson C, Winter JR, Abubakar I. Interpreting whole genome sequencing for investigating tuberculosis transmission: a systematic review. *BMC Med* 2016 Mar 23;14:21.

Bibliografía

7 APÉNDICE DOCUMENTAL

Apéndice documental

Apéndice I: Mecanismos de acción de los principales fármacos antituberculosos y genes implicados en la resistencia

Datos obtenidos de diversas fuentes (93,99,104,108). Abreviaturas: INH - isoniazida; RMP - rifampicina; PZA - pirazinamida; EMB - etambutol; SM - estreptomycin; AMK - amikacina; KAN - kanamicina; CPR - capreomicina; FQ - fluoroquinolonas; ETH - etionamida; PAS - ácido paraaminosalicílico; CS - cicloserina; LZD - linezolid; BDQ - bedaquilina; DMD - delamanid; ACP - proteína transportadora de grupos acilo; CoA - coenzima A; DPPR - decaprenil-fosfato 5-fosforibosiltransferasa; R - resistencia.

Fármaco	Mecanismo de acción del fármaco	Gen involucrado en la resistencia	Función del gen
INH	Inhibición de la biosíntesis de ácidos micólicos y otros efectos	<i>katG</i> (R↑nivel)	Catalasa-peroxidasa (activación del profármaco)
		<i>inhA</i> (R↓nivel)	Enoil-ACP reductasa
		Promotor de <i>mabA-inhA</i>	
		Promotor de <i>ahpC</i>	Alquil hidroperóxido reductasa
		<i>kasA</i>	β-cetoacil-ACP sintasa
		<i>mshA</i>	Glicosil transferasa
RMP	Inhibición de la síntesis de ARN	<i>rpoB</i>	Subunidad β de la ARN polimerasa
PZA	Depleción de energía de la membrana. Inhibición de la traducción. Inhibición del pantotenato y la síntesis de CoA.	<i>pncA</i>	Nicotinamidas / pirazinamidas
		<i>rpsA</i>	Proteína ribosomal S1
		<i>panD</i>	Aspartato descarboxilasa
EMB	Inhibición de la síntesis del arabinogalactano	<i>embB</i>	Arabinosil transferasa
		<i>ubiA</i>	DPPR sintasa
SM	Inhibición de la síntesis proteica	<i>rpsL</i>	Proteína ribosomal 12S
		<i>rrs</i>	ARNr 16S
		<i>gidB</i>	Metiltransferasa del ARNr 16S
AMK / KAN	Inhibición de la síntesis proteica	<i>rrs</i>	ARNr 16S
		<i>eis</i>	Aminoglucósido acetiltransferasa
		<i>whiB7</i>	Regulador transcripcional
CPR	Inhibición de la síntesis proteica	<i>rrs</i>	ARNr 16S
		<i>tlyA</i>	2'-O-metiltransferasa
FQ	Inhibición de la síntesis de ADN	<i>gyrA</i>	Subunidad A de la ADN girasa
		<i>gyrB</i>	Subunidad B de la ADN girasa
ETH	Inhibición de la síntesis de ácidos micólicos	<i>etaA / ethA</i>	Flavin monooxigenasa
		<i>ethR</i>	Represor de la transcripción
		<i>inhA</i>	Enoil-ACP reductasa
PAS	Inhibición del ácido fólico y del metabolismo de los nucleótidos de timina	<i>thyA</i>	Timidilato sintasa
		<i>dfrA</i>	Dihidrofolato reductasa
		<i>folC</i>	Dihidrofolato sintasa
		<i>ribD</i>	Enzima de la biosíntesis de riboflavina

Apéndice documental

Fármaco	Mecanismo de acción del fármaco	Gen involucrado en la resistencia	Función del gen
CS	Inhibición de la síntesis de peptidoglicanos de la pared celular	<i>atr</i>	Alanina racemasa
		<i>ddl</i>	D-alanina-D-alanina ligasa
		<i>cycA</i>	D-serina cotransportador de protones
LZD	Inhibición de la síntesis proteica	<i>rrl</i>	Proteína ribosomal L4
		<i>rplC</i>	Proteína ribosomal L3
BDQ	Inhibición de la ATP sintasa micobacteriana	<i>mmpR</i>	-
DMD	Inhibición de la síntesis del ácido metoximicólico y cetomicólico de la pared celular	<i>fbiA</i>	Proteína FbiA
		<i>fgd1</i>	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

Apéndice II: Resultados obtenidos con el ensayo GenoType MTBC

Abreviaturas: ID – Identificación.

ID Cepa	GenoType MTBC	ID Cepa	GenoType MTBC
CHGUV026	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV124	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV027	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV129	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV028	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV130	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV029	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV131	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV030	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV132	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV031	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV133	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV033	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV136	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV036	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV137	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV038	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV140	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV039	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV142	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV048	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV143	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV049	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV145	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV050	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV146	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV055	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV149	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV056	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV152	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV058	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV153	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV060	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV154	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV062	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV156	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV067	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV157	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV070	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV160	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV071	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV163	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV072	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV168	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV075	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV172	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV078	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV177	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV082	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV186	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV084	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV187	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV088	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV188	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV091	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV190	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV093	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV191	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV096	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV194	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV097	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV196	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV098	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV197	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV099	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV202	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV100	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV203	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV103	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV205	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV108	<i>M. bovis</i> BCG	CHGUV206	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV111	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV207	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV112	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV210	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV115	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV211	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV118	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV212	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV119	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV213	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV123	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	CHGUV214	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>

Apéndice documental

ID Cepa	GenoType MTBC	ID Cepa	GenoType MTBC
CHGUV215	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV839	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV216	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV846	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV217	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV848	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV221	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV850	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV228	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV1000	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV229	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV1008	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV230	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV1011	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV231	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV1012	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV233	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV1015	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV236	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV1449	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV269	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV1590	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV272	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV246	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV278	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV253	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV280	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV256	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV298	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV525	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV305	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV536	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV331	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV548	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV332	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV549	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV336	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV838	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
CHGUV_H37Ra	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV851	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
ICHGUV125	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV854	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
ICHGUV126	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV856	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
ICHGUV127	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV860	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
ICHGUV128	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV861	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
ICHGUV129	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV862	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
ICHGUV130	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV863	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
ICHGUV135	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV868	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
ICHGUV137	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV994	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
ICHGUV245	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV995	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
ICHGUV247	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV1002	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
ICHGUV249	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV1009	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
ICHGUV250	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV1010	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
ICHGUV251	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV1452	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
ICHGUV255	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV1458	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
ICHGUV538	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>	ICHGUV1459	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>
ICHGUV545	<i>M. tuberculosis/M. canettii</i>		

Apéndice III: Resultados de sensibilidad fenotípica de las 155 cepas

Abreviaturas: ID – Identificación; INH – Isoniazida; SM – Estreptomicina; EMB – Etambutol; RMP – Rifampicina; PZA – Pirazinamida; S – Sensible; R – Resistente.

ID Cepa	I N H	S M	E M B	R M P	P Z A
CHGUV026	S	S	S	S	S
CHGUV027	S	S	S	S	S
CHGUV028	S	S	S	S	S
CHGUV029	R	S	S	S	S
CHGUV030	S	S	S	S	S
CHGUV031	S	S	S	S	S
CHGUV033	S	S	S	S	S
CHGUV036	S	S	S	S	S
CHGUV038	S	S	S	S	S
CHGUV039	S	S	S	S	S
CHGUV048	R	S	S	S	S
CHGUV049	S	S	S	S	S
CHGUV050	S	S	S	S	S
CHGUV055	S	S	S	S	S
CHGUV056	S	S	S	S	S
CHGUV058	S	S	S	S	S
CHGUV060	S	S	S	S	S
CHGUV062	S	S	S	S	S
CHGUV067	S	S	S	S	S
CHGUV070	S	S	S	S	S
CHGUV071	S	S	S	S	S
CHGUV072	S	S	S	S	S
CHGUV075	S	S	S	S	S
CHGUV078	S	S	S	S	S
CHGUV082	R	R	S	S	S
CHGUV084	R	R	S	S	S
CHGUV088	S	S	S	S	S
CHGUV091	S	S	S	S	S
CHGUV093	S	S	S	S	S
CHGUV096	S	S	S	S	S
CHGUV097	S	S	S	S	S
CHGUV098	S	S	S	S	S
CHGUV099	S	S	S	S	S
CHGUV100	S	S	S	S	S
CHGUV103	S	S	S	S	S
CHGUV108	R	S	S	S	R
CHGUV111	S	S	S	S	S
CHGUV112	S	S	S	S	S
CHGUV115	S	S	S	S	S
CHGUV118	S	S	S	S	S

ID Cepa	I N H	S M	E M B	R M P	P Z A
CHGUV119	S	S	S	S	S
CHGUV123	S	S	S	S	S
CHGUV124	S	S	S	S	S
CHGUV129	S	S	S	S	S
CHGUV130	S	S	S	S	S
CHGUV131	S	S	S	S	S
CHGUV132	R	S	S	S	S
CHGUV133	S	S	S	S	S
CHGUV136	S	S	S	S	S
CHGUV137	S	R	S	S	S
CHGUV140	S	S	S	S	S
CHGUV142	S	S	S	S	S
CHGUV143	S	S	S	S	S
CHGUV145	S	S	S	S	S
CHGUV146	S	S	S	S	S
CHGUV149	S	S	S	S	S
CHGUV152	S	S	S	S	S
CHGUV153	S	S	S	S	S
CHGUV154	S	S	S	S	S
CHGUV156	S	S	S	S	S
CHGUV157	S	S	S	S	S
CHGUV160	S	S	S	S	S
CHGUV163	S	S	S	S	S
CHGUV168	S	S	S	S	S
CHGUV172	S	S	S	S	S
CHGUV177	R	S	S	S	S
CHGUV186	S	R	S	S	S
CHGUV187	R	S	S	S	S
CHGUV188	S	S	S	S	S
CHGUV190	S	S	S	S	S
CHGUV191	S	S	S	S	S
CHGUV194	S	S	S	S	S
CHGUV196	S	S	S	S	S
CHGUV197	S	S	S	S	S
CHGUV202	S	S	S	S	S
CHGUV203	S	S	S	S	S
CHGUV205	S	S	S	S	S
CHGUV206	S	S	S	S	S
CHGUV207	S	S	S	S	S
CHGUV210	S	S	S	S	S

Apéndice documental

ID Ceba	I N H	S M	E M B	R M P	P Z A
CHGUV211	S	S	S	S	S
CHGUV212	S	S	S	S	S
CHGUV213	S	S	S	S	S
CHGUV214	S	S	S	S	S
CHGUV215	S	S	S	S	S
CHGUV216	S	S	S	S	S
CHGUV217	S	S	S	S	S
CHGUV221	S	S	S	S	S
CHGUV228	S	S	S	S	S
CHGUV229	S	S	S	S	S
CHGUV230	S	S	S	S	S
CHGUV231	S	S	S	S	S
CHGUV233	S	S	S	S	S
CHGUV236	S	S	S	S	S
CHGUV269	S	S	S	S	S
CHGUV272	S	S	S	S	S
CHGUV278	S	S	S	S	S
CHGUV280	S	S	S	S	S
CHGUV298	S	S	S	S	S
CHGUV305	S	S	S	S	S
CHGUV331	S	S	S	S	S
CHGUV332	S	S	S	S	S
CHGUV336	S	S	S	S	S
H37Ra	S	S	S	S	S
ICHGUV125	S	S	S	S	S
ICHGUV126	S	S	S	S	S
ICHGUV127	S	S	S	S	S
ICHGUV128	S	S	S	S	S
ICHGUV129	S	S	S	S	S
ICHGUV130	S	S	S	S	S
ICHGUV135	S	S	S	S	S
ICHGUV137	S	R	S	S	S
ICHGUV245	S	S	S	S	S
ICHGUV247	S	S	S	S	S
ICHGUV249	R	S	S	S	S
ICHGUV250	S	S	S	S	S
ICHGUV251	S	S	S	S	S
ICHGUV255	S	S	S	S	S
ICHGUV538	S	S	S	S	S

ID Ceba	I N H	S M	E M B	R M P	P Z A
ICHGUV545	S	S	S	S	S
ICHGUV839	S	S	S	S	S
ICHGUV846	S	S	S	S	S
ICHGUV848	S	S	S	S	S
ICHGUV850	S	S	S	S	S
ICHGUV1000	S	S	S	S	S
ICHGUV1008	S	S	S	S	S
ICHGUV1011	S	S	S	S	S
ICHGUV1012	S	S	S	S	S
ICHGUV1015	S	S	S	S	S
ICHGUV1449	S	S	S	S	S
ICHGUV1590	S	S	S	S	S
ICHGUV246	S	S	S	S	S
ICHGUV253	S	S	S	S	S
ICHGUV256	S	S	S	S	S
ICHGUV525	S	S	S	S	S
ICHGUV536	S	S	S	S	S
ICHGUV548	S	S	S	S	S
ICHGUV549	S	S	S	S	S
ICHGUV838	S	S	S	S	S
ICHGUV851	S	S	S	S	S
ICHGUV854	S	S	S	S	S
ICHGUV856	S	S	S	S	S
ICHGUV860	S	S	S	S	S
ICHGUV861	S	S	S	S	S
ICHGUV862	S	S	S	S	S
ICHGUV863	R	S	S	S	S
ICHGUV868	S	S	S	S	S
ICHGUV994	S	S	S	S	S
ICHGUV995	S	S	S	S	S
ICHGUV1002	S	S	S	S	S
ICHGUV1009	S	S	S	S	S
ICHGUV1010	S	S	S	S	S
ICHGUV1452	S	S	S	S	S
ICHGUV1458	S	S	S	S	S
ICHGUV1459	S	S	S	S	S

Apéndice IV: Resultados de la sensibilidad genotípica obtenidos mediante GenoType MTBDRplus v.2.0. de las 49 cepas estudiadas y comparación con el método fenotípico

El método fenotípico empleado es *BD BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE Kits*. Las cepas resistentes a un determinado fármaco se resaltan en color rojo y las discrepancias entre ambas técnicas se somborean en rojo. Abreviaturas: ID – Identificación; MUT – mutación; WT – cepa salvaje. *La no detección de la banda *rpoB* WT3 sin la aparición de ninguna banda indicativa de mutación, está recogida en el manual de usuario de la técnica (171), indicando que, en estos casos, se debe tener en cuenta los resultados de la prueba de sensibilidad fenotípica a RMP. Dado lo cual, puesto que la cepa es sensible fenotípicamente a RMP, se consideraría un falso positivo de la técnica.

ID Cepa	Genotípico			Fenotípico	
	GenoType MTBDRplus	INH	RMP	INH	RMP
CHGUV026	Negativo	S	S	S	S
CHGUV029	Negativo	S	S	R	S
CHGUV038	Negativo	S	S	S	S
CHGUV048	<i>inhA</i> MUT1 (C-15T)	R	S	R	S
CHGUV082	<i>katG</i> MUT1 (S315T1)	R	S	R	S
CHGUV084	<i>katG</i> MUT1 (S315T1)	R	S	R	S
CHGUV093	Negativo	S	S	S	S
CHGUV108	Negativo	S	S	R	S
CHGUV111	Negativo	S	S	S	S
CHGUV132	<i>katG</i> MUT1 (S315T1)	R	S	R	S
CHGUV137	Negativo	S	S	S	S
CHGUV154	Negativo	S	S	S	S
CHGUV177	<i>katG</i> MUT1 (S315T1)	R	S	R	S
CHGUV186	Negativo	S	S	S	S
CHGUV187	<i>katG</i> MUT1 (S315T1)	R	S	R	S
CHGUV269	Negativo	S	S	S	S
CHGUV280	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV128	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV129	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV130	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV135	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV137	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV245	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV249	Negativo	S	S	R	S
ICHGUV250	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV255	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV538	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV839	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV846	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV1000	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV1011	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV1012	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV1015	Negativo	S	S	S	S

Apéndice documental

ID Cepa	Genotípico			Fenotípico	
	GenoType MTBDRplus	INH	RMP	INH	RMP
ICHGUV1590	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV548	<i>rpoB</i> WT3 negativo	S	R*	S	S
ICHGUV838	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV851	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV854	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV856	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV860	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV861	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV862	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV863	<i>inhA</i> MUT1 (C-15T)	R	S	R	S
ICHGUV868	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV994	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV995	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV1002	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV1009	Negativo	S	S	S	S
ICHGUV1459	Negativo	S	S	S	S

Apéndice V: Resultados de la sensibilidad genotípica (WGS y GenoType) y fenotípica de 55 cepas

Los métodos genotípicos empleados son WGS (W) y GenoType MTBDRplus v.2.0. (G); mientras que el método fenotípico (F) usado es *BD BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE Kits* (para INH, RMP, EMB y SM) y *BD BACTEC™ MGIT™ 960 PZA Kit* (para PZA). Las cepas resistentes a un determinado fármaco se resaltan en color rojo y las discrepancias entre las técnicas se somborean en rojo. El color azul indica un falso positivo de la técnica. Abreviaturas: ID – Identificación.

ID Cepa	INH			RMP			EMB		SM		PZA		F Q	AMK KAN CPR	INH ETH	E T H
	W	G	F	W	G	F	W	F	W	F	W	F	W	W	W	W
CHGUV38	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CHGUV154	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CHGUV269	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CHGUV280	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV125	S	-	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV126	S	-	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV127	S	-	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV128	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV129	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV130	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV135	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV137	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
ICHGUV245	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV247	S	-	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV249	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV250	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV251	S	-	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV255	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV538	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV545	S	-	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV839	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV846	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV848	S	-	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV850	S	-	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV1000	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV1008	S	-	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV1011	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV1012	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV1015	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV1449	S	-	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV1590	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV246	S	-	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV253	S	-	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Apéndice documental

ID Cepa	INH			RMP			EMB		SM		PZA		F Q	AMK KAN CPR	INH ETH	E T H
	W	G	F	W	G	F	W	F	W	F	W	F	W	W	W	W
ICHGUV256	S	-	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV525	S	-	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV536	S	-	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV548	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV549	S	-	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV838	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV851	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV854	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV856	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV860	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV861	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV862	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV863	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
ICHGUV868	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV994	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
ICHGUV995	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV1002	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV1009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV1010	S	-	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV1452	S	-	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV1458	S	-	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ICHGUV1459	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Apéndice VI: Tabla alélica MIRU-VNTR 24 loci descrita por Supply et al. (175)

Los marcadores están codificados por convenio con números que indican su posición (en kpb) en el cromosoma H37Rv de *M. tuberculosis*. En esta tabla se muestra el número de repeticiones estimadas en función del tamaño del amplicón (pb) para cada locus. Los tamaños sombreados en amarillo hacen referencia a la cepa H37Rv/Ra, excepto para el MIRU 04, el cual se representa en una tabla aparte. Abreviaturas: M – Marcador ; Rep. – Repeticiones; pb – pares de bases.

M	Alias 1	Alias 2	H37Rv/ H37Ra	Rep. (pb)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
154	MIRU 02		2	53	402	455	508	561	614	667	720	773	826	879	932	985	1038	1091	1144	1197
424	Mtub 04	VNTR 42	2	51	537	588	639	690	741	792	843	894	945	996	1047	1098	1149	1200	1251	1302
577	ETRC	VNTR 43	4	58	171	208	266	324	382	440	498	556	614	672	730	788	846	904	962	1020
580	MIRU 04		3'	77	175	252	329	406	483	560	637	714	791	868	945	1022	1099	1176	1253	1330
802	MIRU 40		1	54	354	408	462	516	570	624	678	732	786	840	894	948	1002	1056	1110	1164
960	MIRU 10		3	53	482	537	590	643	696	749	802	855	908	961	1014	1067	1120	1173	1226	1279
1644	MIRU 16		2	53	565	618	671	724	777	830	883	936	989	1042	1095	1148	1201	1254	1307	1360
1955	Mtub 21	1955	2	57	116	149	206	263	320	377	434	491	548	605	662	719	776	833	890	947
2059	MIRU 20		2	77	437	514	591	668	745	822	899	976	1053	1130	1207	1284	1361	1438	1515	1592
2163	QUB2163b	QUB-11b	5	69	67	136	205	274	343	412	481	550	619	688	757	826	895	964	1033	1102
2165	ETRA		3	75	195	270	345	420	495	570	645	720	795	870	945	1020	1095	1170	1245	1320
2347	Mtub 29	VNTR 46	4	57	335	392	449	506	563	620	677	734	791	848	905	962	1019	1076	1133	1190
2401	Mtub 30	VNTR 47	2	58	252	305	363	421	479	537	595	653	711	769	827	885	943	1001	1059	1117
2461	ETRB	VNTR 48	3	57	347	404	461	518	575	632	689	746	803	860	917	974	1031	1088	1145	1202
2531	MIRU 23		6	53	150	200	253	306	359	412	465	518	571	624	677	730	783	836	889	942
2687	MIRU 24		1	54	395	447	501	555	609	663	717	771	825	879	933	987	1041	1095	1149	1203
2996	MIRU 26		3	51	285	336	387	438	489	540	591	642	693	744	795	846	897	948	999	1050
3007	MIRU 27	QUB-5	3	53	498	551	604	657	710	763	816	869	922	975	1028	1081	1134	1187	1240	1293
3171	Mtub 34	VNTR 49	3	54	326	380	434	488	542	596	650	704	758	812	866	920	974	1028	1082	1136
3192	MIRU 31	ETRE	3	53	492	545	598	651	704	757	810	863	916	969	1022	1075	1128	1181	1234	1287
3690	Mtub 39	VNTR 52	5	58	272	330	388	446	504	562	620	678	736	794	852	910	968	1026	1084	1142
4052	QUB-26		5	111	153	264	375	486	597	708	819	930	1041	1152	1263	1374	1485	1596	1707	1818
4156	QUB4156	VNTR 53	2	59	563	622	681	740	799	858	917	976	1035	1094	1153	1212	1271	1330	1389	1448
4348	MIRU 39		2	53	540	593	646	699	752	805	858	911	964	1017	1070	1123	1176	1229	1282	1335

Apéndice documental

MIRU-VNTR específico para los alelos del MIRU 04

Alelo	Alias	MIRU 04
0'	0s	122
1'	1s	199
2'	2s	276
3'	3s	353
4'	4s	430
5'	5s	507
6'	6s	584
7'	7s	661
8'	8s	738
9'	9s	815

Apéndice VII: Cepas estudiadas mediante MIRU-VNTR 24 loci

Tabla obtenida mediante la plataforma *on-line* MIRU-VNTRplus. Linajes obtenidos mediante tipificación de SNP (HRM/WGS).

ID	Especie	Lineage	HRM_02	HRM_03	HRM_04	HRM_05	HRM_06	HRM_07	HRM_08	HRM_09	HRM_10	HRM_11	HRM_12	HRM_13	HRM_14	HRM_15	HRM_16	HRM_17	HRM_18	HRM_19	HRM_20	HRM_21	HRM_22	HRM_23	HRM_24	INH	SM	EMD	RMP	PZA
CHGU026	M. tuberculosis(s)	lineage4.3(s)	2	2	4	2	1	4	2	3	2	3	2	4	1	2	6	1	5	3	3	3	2	1	2	2	s	s	s	s
CHGU027	M. tuberculosis(s)	lineage4.3(s)	1	3	2	2	5	3	3	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	3	2	2	6	2	2	s	s	s	s
CHGU028	M. tuberculosis(s)	lineage4.1.2(s)	2	2	3	2	3	5	3	3	1	3	2	4	2	3	1	5	3	3	2	2	7	3	2	2	s	s	s	s
CHGU029	M. tuberculosis(s)	lineage4.2(s)	2	3	5	2	3	7	1	3	2	2	4	4	4	2	5	1	1	3	3	2	3	4	2	2	r	s	s	s
CHGU030	M. tuberculosis(s)	lineage4.1.2(s)	2	3	3	1	5	5	1	2	2	7	3	4	4	2	5	1	5	4	3	3	3	6	3	2	s	s	s	s
CHGU031	M. tuberculosis(s)	lineage4.2(s)	2	1	4	2	2	5	1	3	2	2	3	4	4	2	5	1	1	3	3	3	8	3	2	2	s	s	s	s
CHGU033	M. tuberculosis(s)	lineage4.1.2(s)	2	2	3	2	3	5	3	2	5	3	4	4	2	5	1	5	3	3	3	2	3	3	2	2	s	s	s	s
CHGU036	M. tuberculosis(s)	lineage4.1.2(s)	2	2	3	2	5	3	2	1	4	3	2	4	2	3	1	5	3	3	3	6	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU038	M. tuberculosis(s)	lineage4.1.2(s)	2	2	3	2	5	3	2	2	3	4	4	2	5	1	1	3	1	3	3	6	3	2	2	2	s	s	s	s
CHGU039	M. tuberculosis(s)	lineage4.4(s)	2	3	4	3	4	3	2	2	3	2	4	2	2	5	1	5	3	3	3	8	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU048	M. tuberculosis(s)	lineage4.3(s)	2	3	4	2	3	4	3	2	2	2	4	2	2	6	1	3	3	1	3	1	7	2	2	2	s	s	s	s
CHGU049	M. tuberculosis(s)	lineage4.1.2(s)	2	2	3	2	5	3	2	1	4	3	2	4	2	3	1	5	3	3	3	6	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU050	M. tuberculosis(s)	lineage4.10(s)	2	2	4	3	2	3	4	2	2	4	2	4	2	5	1	5	3	3	3	6	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU055	M. tuberculosis(s)	lineage3(s)	2	4	2	3	6	4	2	2	2	4	2	2	2	5	1	3	3	4	4	2	3	4	2	3	s	s	s	s
CHGU056	M. tuberculosis(s)	lineage4.3(s)	1	3	4	3	5	4	3	2	2	2	4	4	2	3	1	5	3	3	2	8	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU058	M. tuberculosis(s)	lineage4.1.2(s)	2	3	3	3	6	3	3	2	8	3	4	4	2	5	1	5	3	3	3	6	3	2	2	2	s	s	s	s
CHGU060	M. tuberculosis(s)	lineage4.3(s)	2	3	4	3	4	5	2	2	3	2	4	2	2	6	1	7	3	3	5	5	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU062	M. tuberculosis(s)	lineage4.3(s)	1	3	4	2	5	4	3	3	2	2	4	1	2	6	1	3	3	3	2	2	7	2	2	2	s	s	s	s
CHGU067	M. tuberculosis(s)	lineage4.10(s)	2	1	4	2	5	3	2	2	5	3	4	2	2	5	1	5	3	3	3	5	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU070	M. tuberculosis(s)	lineage4.10(s)	2	3	4	3	2	4	4	2	4	2	4	2	2	5	1	5	3	3	3	8	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU071	M. tuberculosis(s)	lineage4.3(s)	2	5	4	3	4	3	2	3	2	3	2	4	2	7	1	3	3	1	3	1	7	2	2	2	s	s	s	s
CHGU072	M. tuberculosis(s)	lineage4.10(s)	2	2	2	2	4	2	1	2	4	3	2	2	2	4	1	3	3	3	3	7	1	2	2	2	s	s	s	s
CHGU075	M. tuberculosis(s)	lineage1(s)	2	2	4	6	4	5	3	6	2	6	3	1	1	6	2	3	3	3	4	4	6	1	3	3	s	s	s	s
CHGU078	M. tuberculosis(s)	lineage4.3(s)	2	2	4	3	4	4	3	2	2	2	2	4	2	7	1	2	4	2	7	4	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU082	M. tuberculosis(s)	lineage4.3(s)	2	2	4	2	1	4	2	3	3	2	4	1	1	6	1	5	3	3	2	8	2	2	2	2	r	s	s	s
CHGU084	M. tuberculosis(s)	lineage4.3(s)	2	2	4	2	1	4	2	3	3	2	4	1	1	6	1	5	3	3	2	8	2	2	2	2	r	s	s	s
CHGU088	M. tuberculosis(s)	lineage4.1.2(s)	2	2	3	2	3	5	3	3	2	5	3	4	4	2	4	1	5	3	3	3	2	3	2	2	s	s	s	s
CHGU091	M. tuberculosis(s)	lineage4.10(s)	3	3	4	2	5	3	1	2	2	4	3	4	2	4	1	5	3	3	3	5	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU093	M. tuberculosis(s)	lineage4.2(s)	2	3	5	2	3	7	1	3	2	2	4	4	2	5	1	3	3	4	2	4	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU096	M. tuberculosis(s)	lineage4.4(s)	3	3	5	3	2	3	3	1	2	5	4	4	2	5	1	4	3	3	2	9	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU097	M. tuberculosis(s)	lineage4.10(s)	2	2	4	2	6	3	3	2	2	2	3	4	2	2	6	1	5	3	3	2	5	2	2	2	s	s	s	s
CHGU098	M. tuberculosis(s)	lineage4.6.2(s)	2	2	4	3	1	3	3	3	1	5	4	4	2	5	1	5	3	3	2	5	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU099	M. tuberculosis(s)	lineage4.3(s)	2	4	4	2	5	3	7	3	3	2	2	1	4	2	6	1	5	3	3	1	4	1	5	2	s	s	s	s
CHGU100	M. tuberculosis(s)	lineage4.3(s)	2	2	4	3	2	4	2	3	2	2	2	4	1	6	1	4	3	1	3	1	4	2	2	2	s	s	s	s
CHGU103	M. tuberculosis(s)	lineage4.10(s)	2	3	4	2	5	3	3	2	2	4	3	4	2	1	5	5	3	3	3	6	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU108	M. bovis BCG(s)	M. bovis(s)	2	0	5	1	2	3	3	1	2	3	1	2	2	5	4	2	3	3	2	5	2	0	2	2	s	s	s	r
CHGU111	M. tuberculosis(s)	lineage4.3(s)	2	3	4	2	3	4	3	2	2	4	2	4	2	6	1	3	3	1	2	3	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU112	M. tuberculosis(s)	lineage4.3(s)	1	4	4	6	5	3	3	2	2	2	4	1	2	7	1	5	1	3	2	8	3	2	2	2	s	s	s	s
CHGU115	M. tuberculosis(s)	lineage4.3(s)	2	2	4	2	3	4	2	3	2	2	4	2	2	6	1	4	3	1	3	1	4	2	2	2	s	s	s	s
CHGU118	M. tuberculosis(s)	lineage4.6.2(s)	2	3	4	1	2	3	3	1	5	4	4	2	5	1	5	3	3	2	5	2	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU119	M. tuberculosis(s)	lineage4.10(s)	2	3	4	3	4	3	2	2	2	3	4	1	2	5	1	5	3	3	3	6	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU123	M. tuberculosis(s)	lineage4.1.2(s)	2	2	3	2	5	3	2	1	4	3	2	4	2	3	1	5	3	3	3	6	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU124	M. tuberculosis(s)	lineage4.3(s)	2	5	4	3	2	4	3	2	2	4	2	2	6	1	6	3	3	4	5	5	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU129	M. tuberculosis(s)	lineage4.1.2(s)	2	2	4	3	2	3	6	3	2	2	4	4	2	5	1	5	3	3	2	5	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU130	M. tuberculosis(s)	lineage4.1.2(s)	2	2	3	2	3	6	3	2	2	5	3	4	4	2	5	1	5	2	3	3	6	3	2	2	s	s	s	s
CHGU131	M. tuberculosis(s)	lineage4.1.2(s)	2	2	3	3	6	3	2	2	6	3	4	4	2	5	1	5	3	2	3	6	3	2	2	2	s	s	s	s
CHGU132	M. tuberculosis(s)	lineage4.3(s)	2	2	4	2	1	4	2	3	2	2	4	1	1	6	1	4	3	2	2	4	2	2	2	2	r	s	s	s
CHGU133	M. tuberculosis(s)	lineage4.1.2(s)	2	2	3	2	3	6	3	2	2	4	3	4	4	2	5	1	5	3	3	6	3	2	2	2	s	s	s	s
CHGU136	M. tuberculosis(s)	lineage4.1.2(s)	2	2	3	2	3	6	3	2	2	4	3	4	4	2	5	1	5	3	3	6	3	2	2	2	s	s	s	s
CHGU137	M. tuberculosis(s)	lineage4.1.2(s)	2	2	3	2	1	5	3	2	1	5	3	2	4	2	3	1	5	3	3	4	7	2	2	2	r	s	s	s
CHGU140	M. tuberculosis(s)	lineage4.10(s)	2	2	4	2	2	3	2	2	2	5	3	4	2	2	5	1	5	3	3	5	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU142	M. tuberculosis(s)	lineage4.3(s)	1	3	4	4	4	3	2	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	3	6	3	2	2	2	s	s	s	s
CHGU143	M. tuberculosis(s)	lineage4. No sublineage(s)	2	4	2	2	3	3	2	3	3	4	2	1	2	1	5	5	3	3	3	2	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU145	M. tuberculosis(s)	lineage4. No sublineage(s)	2	2	4	2	5	3	2	1	5	3	4	2	2	5	1	3	3	3	4	2	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU146	M. tuberculosis(s)	lineage4.1.2(s)	2	2	3	2	5	3	3	2	5	3	4	4	2	5	1	5	3	2	3	6	3	2	2	2	s	s	s	s
CHGU149	M. tuberculosis(s)	lineage4.10(s)	2	3	4	3	4	4	3	2	2	3	4	2	2	6	1	5	3	3	3	5	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU152	M. tuberculosis(s)	lineage4.10(s)	2	2	4	2	4	3	2	2	3	4	2	2	6	1	5	3	3	3	5	2	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU153	M. tuberculosis(s)	lineage4.1.2(s)	2	3	2	2	5	3	2	2	6	3	4	4	2	5	1	4	2	3	2	3	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU154	M. tuberculosis(s)	lineage4.1.2(s)	2	2	3	2	6	2	3	2	3	4	4	5	1	5	1	5	1	3	3	6	2	2	2	2	s	s	s	s
CHGU156	M. tuberculosis(s)	lineage4.3(s)	2	4	4	3	6	3	3	2	4	2	4	2	7															

Apéndice documental

ID	Species	Lineage	IS6110	IS6113	IS6118	IS6120	IS6121	IS6122	IS6123	IS6124	IS6125	IS6126	IS6127	IS6128	IS6129	IS6130	IS6131	IS6132	IS6133	IS6134	IS6135	IS6136	IS6137	IS6138	IS6139	IS6140	INH	SM	EMB	RMP	PZA		
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28		
ICHGU1000	M. tuberculosis(v)	lineage4.1.2(u)	2	2	3	2	3	5	3	2	2	9	3	4	4	2	5	1	5	4	3	3	3	5	3	2	5	5	5	5	5		
ICHGU1002	M. tuberculosis(v)	lineage4.8(u)	2	2	4	2	5	3	1	2	2	3	3	4	2	2	5	1	6	3	3	3	5	2	2	5	5	5	5	5	5		
ICHGU1008	M. tuberculosis(v)	lineage4.8(u)	2	2	5	2	4	3	1	2	2	4	2	2	4	2	2	6	1	5	3	2	3	6	5	2	2	5	5	5	5	5	
ICHGU1009	M. tuberculosis(v)	lineage4.4(u)	2	3	4	3	3	1	2	4	3	4	2	2	5	1	5	3	2	2	3	5	2	2	5	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU1010	M. tuberculosis(v)	lineage4.1.2(u)	2	2	3	2	3	5	3	2	2	3	4	4	2	5	1	4	3	3	3	6	3	2	5	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU1011	M. tuberculosis(v)	lineage4.8(u)	2	2	5	2	4	3	1	2	2	4	2	2	6	1	5	3	2	3	3	6	5	2	2	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU1012	M. tuberculosis(v)	lineage4.1.2(u)	2	2	3	2	3	5	3	2	2	9	3	4	4	2	5	1	5	4	3	3	3	5	3	2	5	5	5	5	5	5	
ICHGU1015	M. tuberculosis(v)	lineage4.3(u)	1	3	4	2	6	3	3	2	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	6	2	2	5	5	5	5	5	5	
ICHGU1125	M. tuberculosis(v)	lineage4.1.2(u)	2	2	3	2	3	5	3	3	2	3	4	4	2	5	1	5	3	3	4	3	3	2	5	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU1126	M. tuberculosis(v)	lineage4.8(u)	2	2	4	2	2	3	4	2	2	8	2	4	2	2	5	1	4	1	2	3	3	5	2	2	5	5	5	5	5	5	
ICHGU1127	M. tuberculosis(v)	lineage4.4(u)	2	4	4	3	4	3	1	2	4	2	2	5	1	5	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	5	5	5	5	5	5	
ICHGU1128	M. tuberculosis(v)	lineage4.3(u)	2	4	4	2	8	4	3	3	1	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	2	3	2	2	5	5	5	5	5	5	
ICHGU1129	M. tuberculosis(v)	lineage3(u)	2	4	2	2	3	6	2	4	2	2	4	2	2	5	1	8	3	3	4	3	6	3	3	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU1130	M. tuberculosis(v)	lineage4.1.2(u)	2	3	2	3	5	3	2	2	6	3	4	4	2	5	1	5	4	2	3	3	4	3	2	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU1135	M. tuberculosis(v)	lineage4.7(u)	2	2	4	2	4	3	3	2	2	3	4	2	2	6	1	5	3	3	3	5	2	2	5	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU1137	M. tuberculosis(v)	lineage4.3(u)	2	2	2	4	4	2	2	2	3	2	4	2	2	2	1	5	3	1	3	1	6	2	2	5	5	5	5	5	5	5	5
ICHGU1449	M. tuberculosis(v)	lineage4.8(u)	2	2	5	2	4	3	1	2	2	4	2	2	6	1	5	3	2	3	6	5	2	2	5	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU1452	M. tuberculosis(v)	lineage4.3(u)	2	1	4	2	7	3	2	2	2	5	3	4	2	2	5	1	5	3	3	3	5	2	2	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU1458	M. tuberculosis(v)	lineage4.8(u)	2	2	4	2	1	3	1	2	2	3	3	4	2	2	5	1	5	3	3	2	3	2	2	2	5	5	5	5	5	5	5
ICHGU1459	M. tuberculosis(v)	lineage4.7(u)	2	2	4	2	3	3	4	2	2	2	2	4	2	2	6	1	5	3	3	5	5	2	2	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU1590	M. tuberculosis(v)	lineage4.1.2(u)	2	2	3	2	3	4	2	3	2	3	4	4	2	5	1	5	1	3	3	6	3	2	5	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU245	M. tuberculosis(v)	lineage4.3(u)	2	4	2	4	3	4	2	2	4	2	4	2	2	1	3	3	1	3	1	8	2	2	5	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU246	M. tuberculosis(v)	lineage4.8(u)	2	2	4	2	4	3	2	2	2	5	3	4	2	2	5	1	4	3	3	3	5	2	2	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU247	M. tuberculosis(v)	lineage4.1.2(u)	2	3	2	3	5	2	3	2	2	5	3	4	4	2	5	1	5	3	3	3	4	3	2	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU249	M. tuberculosis(v)	lineage4.1.2(u)	2	2	3	2	3	4	2	3	2	3	4	4	2	5	1	5	1	3	3	6	3	3	2	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU250	M. tuberculosis(v)	lineage4.3(u)	1	3	2	5	4	2	1	2	2	4	1	2	4	1	5	3	3	2	8	3	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU251	M. tuberculosis(v)	lineage4.1.2(u)	2	2	3	2	3	5	3	2	5	3	4	4	2	5	1	5	3	3	2	3	2	3	2	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU253	M. tuberculosis(v)	lineage4.4(u)	2	3	4	2	2	2	1	2	6	1	4	2	2	1	4	2	3	3	1	6	2	2	5	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU255	M. tuberculosis(v)	lineage4.1.2(u)	2	2	3	2	3	5	3	2	1	6	3	2	4	2	3	1	5	3	3	3	6	2	2	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU256	M. tuberculosis(v)	lineage4.1.2(u)	2	2	3	2	1	5	3	4	2	1	3	4	4	2	5	1	5	3	3	3	5	3	2	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU255	M. tuberculosis(v)	lineage4.8(u)	2	2	4	2	3	1	2	2	3	4	2	2	5	1	6	3	3	5	5	2	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU536	M. tuberculosis(v)	lineage4.7(u)	2	2	4	2	4	3	3	2	2	3	4	2	2	6	1	5	3	3	3	5	2	2	5	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU538	M. tuberculosis(v)	lineage4.3(u)	2	3	4	2	1	4	2	3	2	4	2	4	1	1	6	1	5	3	2	2	8	2	2	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU545	M. tuberculosis(v)	lineage4.8(u)	2	2	2	2	3	4	2	2	3	2	4	2	2	5	1	5	3	3	3	4	2	2	5	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU548	M. tuberculosis(v)	lineage4.8(u)	2	2	4	2	2	3	4	2	2	4	2	2	2	5	1	5	3	3	3	5	2	2	5	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU549	M. tuberculosis(v)	lineage4.3(u)	1	3	4	2	6	4	3	3	2	2	4	1	2	7	1	5	1	3	2	7	3	2	5	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU838	M. tuberculosis(v)	lineage4.1.2(u)	2	2	3	2	3	5	2	2	6	3	4	4	2	5	1	5	2	3	3	4	3	2	5	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU839	M. tuberculosis(v)	lineage4.3(u)	1	3	4	2	5	3	3	2	2	2	4	1	2	6	1	5	3	3	2	6	2	2	5	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU846	M. tuberculosis(v)	lineage4.1.2(u)	2	2	3	2	3	5	3	3	2	4	3	4	4	2	5	1	5	3	3	3	3	3	2	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU848	M. tuberculosis(v)	lineage4.3(u)	2	5	4	2	1	4	2	3	2	4	2	4	1	1	6	1	5	3	2	2	8	2	2	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU850	M. tuberculosis(v)	lineage4.3(u)	1	3	4	2	5	3	3	2	2	4	2	4	1	2	6	1	5	3	2	6	2	2	5	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU851	M. tuberculosis(v)	lineage4.6.2(u)	2	2	4	2	4	3	3	1	5	4	4	2	2	5	1	5	3	3	5	2	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU854	M. tuberculosis(v)	lineage2(u)	2	2	4	2	3	3	3	5	2	3	4	4	2	5	1	8	2	4	3	9	2	3	5	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU856	M. tuberculosis(v)	lineage4.8(u)	2	2	4	1	4	3	1	2	2	4	3	4	2	1	5	1	5	3	2	3	4	2	2	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU860	M. tuberculosis(v)	lineage4.1.2(u)	2	2	3	2	4	5	3	2	2	5	3	4	2	5	1	5	4	2	3	3	4	2	5	5	5	5	5	5	5	5	
ICHGU861	M. tuberculosis(v)	lineage4.3(u)	2	3	4	2	1	5	1	3	1	4	2	4	1	1	6	1	5	2	1	3	2	7	2	2	5	5	5	5	5	5	
ICHGU862	M. tuberculosis(v)	lineage2(u)	2	2	4	2	3	3	5	2	7	4	4	4	2	5	1	5	3	3	4	1	8	2	3	5	5	5	5	5			

Apéndice documental

Apéndice IX: Nomenclatura MLVA MtbC15-9 de los genotipos MIRU-VNTR estudiados

Códigos asignados por la plataforma *on-line* MIRU-VNTRplus. Los códigos marcados con un asterisco no estaban presentes previamente en dicha base de datos.

ID Cepa	MLVA MtbC15-9
CHGUV026	21281-62*
CHGUV027	21282-51*
CHGUV028	707-76
CHGUV029	814-15
CHGUV030	21283-73*
CHGUV031	1057-15
CHGUV033	2109-15
CHGUV036	21284-76*
CHGUV038	4766-29
CHGUV039	9602-15
CHGUV048	21285-53*
CHGUV049	366-1511
CHGUV050	21286-15*
CHGUV055	21287-572*
CHGUV056	21288-567*
CHGUV058	21289-15*
CHGUV060	21290-62*
CHGUV062	21291-51*
CHGUV067	1537-15
CHGUV070	21292-15*
CHGUV071	21293-308*
CHGUV072	21294-30*
CHGUV075	21295-41*
CHGUV078	21293-308*
CHGUV082	3509-92
CHGUV084	3509-92
CHGUV088	2109-82
CHGUV091	21296-1556*
CHGUV093	814-15
CHGUV096	21297-80*
CHGUV097	21298-62*
CHGUV098	21299-26*
CHGUV099	21300-53*
CHGUV100	21301-92*
CHGUV103	21302-66*
CHGUV108	21303-217*
CHGUV111	21304-53*
CHGUV112	21305-840*
CHGUV115	21306-53*

ID Cepa	MLVA MtbC15-9
CHGUV118	21307-26*
CHGUV119	21308-15*
CHGUV123	366-76
CHGUV124	21309-62*
CHGUV129	21310-17*
CHGUV130	13013-17
CHGUV131	21311-17*
CHGUV132	21312-118*
CHGUV133	473-15
CHGUV136	21313-111*
CHGUV137	21314-76*
CHGUV140	2067-15
CHGUV142	21315-51*
CHGUV143	20190-1092
CHGUV145	11293-162
CHGUV146	5208-15
CHGUV149	21316-62*
CHGUV152	569-62
CHGUV153	14440-76
CHGUV154	21317-29*
CHGUV156	21318-308*
CHGUV157	21319-1132*
CHGUV160	600-28
CHGUV163	21320-92*
CHGUV168	21321-62*
CHGUV172	21322-62*
CHGUV177	21323-66*
CHGUV186	21324-31*
CHGUV187	21325-66*
CHGUV188	21326-53*
CHGUV190	21327-76*
CHGUV191	21328-76*
CHGUV194	21329-51*
CHGUV196	21327-76*
CHGUV197	21330-826*
CHGUV202	21331-76*
CHGUV203	18445-15
CHGUV205	21328-76*
CHGUV206	91-26

Apéndice documental

ID Cepa	MLVA MtbC15-9
CHGUV207	21326-53*
CHGUV210	21284-76*
CHGUV211	860-15
CHGUV212	9927-415
CHGUV213	91-26
CHGUV214	21332-415*
CHGUV215	21333-881*
CHGUV216	21334-15*
CHGUV217	4228-62
CHGUV221	21335-26*
CHGUV228	366-76
CHGUV229	21284-76*
CHGUV230	21336-76*
CHGUV231	21284-76*
CHGUV233	21337-17*
CHGUV236	21337-17*
CHGUV269	4766-29
CHGUV272	21338-62*
CHGUV278	21339-119*
CHGUV280	4766-29
CHGUV298	21339-119*
CHGUV305	21340-15*
CHGUV331	21341-15*
CHGUV332	21341-15*
CHGUV336	21341-15*
CHGUV_H37Ra	21342-64
ICHGUV125	18280-15
ICHGUV126	4470-576
ICHGUV127	21343-15*
ICHGUV128	21344-155*
ICHGUV129	21345-32*
ICHGUV130	9927-415
ICHGUV135	569-62
ICHGUV137	21346-1619*
ICHGUV245	21347-603*
ICHGUV247	11280-15
ICHGUV249	21348-29*
ICHGUV250	21349-83*
ICHGUV251	2109-15

ID Cepa	MLVA MtbC15-9
ICHGUV255	4476-76
ICHGUV538	4157-118
ICHGUV545	11200-15
ICHGUV839	21350-51*
ICHGUV846	21351-15*
ICHGUV848	4175-118
ICHGUV850	21350-51*
ICHGUV1000	193-73
ICHGUV1008	9768-154
ICHGUV1011	9768-154
ICHGUV1012	193-73
ICHGUV1015	3136-51
ICHGUV1449	9768-154
ICHGUV1590	21348-29*
ICHGUV246	6699-15
ICHGUV253	21352-1620*
ICHGUV256	21341-15*
ICHGUV525	21353-15*
ICHGUV536	569-62
ICHGUV548	4228-15
ICHGUV549	534-840
ICHGUV838	21354-17*
ICHGUV851	21355-26*
ICHGUV854	21356-25*
ICHGUV856	1618-65
ICHGUV860	21357-415*
ICHGUV861	21358-1180*
ICHGUV862	21359-32*
ICHGUV863	21360-53*
ICHGUV868	21361-313*
ICHGUV994	21362-1621*
ICHGUV995	7926-17
ICHGUV1002	17071-15
ICHGUV1009	21363-17*
ICHGUV1010	21364-15*
ICHGUV1452	21365-15*
ICHGUV1458	8222-15
ICHGUV1459	21366-62*

Apéndice X: Frecuencia alélica de cada uno de los 24 loci en las 155 cepas estudiadas

MIRU	Frecuencia alélica absoluta (Frecuencia alélica relativa)																						
	Copias	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	30	2 (+4)
154 (MIRU 02)	0	11 (7,1)	140 (90,3)	4 (2,6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
424 (VNTR 42)	1 (0,6)	4 (2,6)	91 (58,7)	41 (26,5)	14 (9,0)	4 (2,6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
577 (VNTR 43)	0	0	6 (3,9)	57 (36,8)	82 (52,9)	10 (6,5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
580 (MIRU 04)	1 (0,6)	2 (1,3)	105 (67,7)	39 (25,2)	3 (1,9)	3 (1,9)	2 (1,3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
802 (MIRU 40)	1 (0,6)	22 (14,2)	29 (18,7)	58 (37,4)	23 (14,8)	12 (7,7)	6 (3,9)	1 (0,6)	2 (1,3)	1 (0,6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
960 (MIRU 10)	0	0	5 (3,2)	48 (31,0)	34 (21,9)	56 (36,1)	8 (5,2)	3 (1,9)	0	0	0	1 (0,6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1644 (MIRU 16)	0	16 (10,3)	39 (25,2)	87 (56,1)	11 (7,1)	1 (0,6)	1 (0,6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1955 (Mtub 21)	0	13 (8,4)	74 (47,7)	55 (35,5)	8 (5,2)	2 (1,3)	2 (1,3)	1 (0,6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2059 (MIRU 20)	0	25 (16,1)	13 (8,9)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2163 (QUB-11b)	0	4 (2,6)	38 (24,5)	30 (19,4)	43 (27,7)	26 (16,8)	6 (3,9)	2 (1,3)	2 (1,3)	2 (1,3)	0	0	1 (0,6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0,6)
2165 (ETRA)	0	5 (3,2)	47 (30,3)	85 (54,8)	13 (8,4)	1 (0,6)	2 (1,3)	0	0	0	1 (0,6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0,6)	0	0
2347 (VNTR 46)	0	0	21 (13,5)	4 (2,6)	129 (83,2)	1 (0,6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2401 (VNTR 47)	0	26 (16,8)	69 (44,5)	1 (0,6)	59 (38,1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2461 (VNTR 48)	0	15 (9,7)	137 (88,4)	1 (0,6)	1 (0,6)	1 (0,6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2531 (MIRU 23)	0	1 (0,6)	3 (1,9)	20 (12,9)	5 (3,2)	76 (49,0)	43 (27,7)	5 (3,2)	1 (0,6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0,6)	0
2687 (MIRU 24)	0	151 (97,4)	3 (1,9)	0	1 (0,6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Continúa en la página siguiente

Apéndice documental

MIRU	Copias																					
	Frecuencia alélica absoluta (Frecuencia alélica relativa)																					
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	30	2 (+4)
2996 (MIRU 26)	0	3 (1,9)	3 (1,9)	11 (7,1)	8 (5,2)	11 (7,1)	7 (4,5)	1 (0,6)	4 (2,6)	1 (0,6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3007 (MIRU 27)	0	9 (5,8)	2 (1,3)	135 (87,1)	8 (5,2)	1 (0,6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3171 (VNTR 49)	0	15 (9,7)	22 (14,2)	118 (76,1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3192 (MIRU 31)	0	0	15 (9,7)	127 (81,9)	12 (7,7)	1 (0,6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3690 (VNTR 52)	1 (0,6)	15 (9,7)	35 (22,6)	82 (52,9)	10 (6,5)	6 (3,9)	3 (1,9)	0	0	0	1 (0,6)	0	0	1 (0,6)	0	0	0	1 (0,6)	0	0	0	0
4052 (QUB-26)	0	2 (1,3)	3 (1,9)	9 (5,8)	17 (11,0)	46 (29,7)	44 (28,4)	19 (12,3)	12 (7,7)	2 (1,3)	1 (0,6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4156 (VNTR 53)	1 (0,6)	4 (2,6)	100 (64,5)	50 (32,3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4348 (MIRU 39)	0	5 (3,2)	143 (92,3)	6 (3,9)	1 (0,6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Apéndice XI: Asignación de linajes en función de la metodología empleada

Comparación de los linajes obtenidos mediante MIRU-VNTR 24 loci respecto al tipado de SNP. La asignación de linajes mediante MIRU se realizó usando la plataforma MIRU-VNTRplus. Primero mediante búsqueda por similitud (*similarity search*) y en los casos no concluyentes, se realizó *a posteriori* por el método de identificación basada en árbol filogenético (*tree-based identification*), ya sea por el método NJ o UPGMA. La asignación mediante tipado de SNP se realizó mediante HRM o *in silico* tras WGS. Los linajes L4.7, L4.8 y L4.9 (obtenidos *in silico*) están englobados dentro del L4.10, por lo que no se consideran discrepantes. El sub-linaje H37Rv asignado por la plataforma MIRU-VNTRplus hace referencia al linaje L4.10 (también denominado PGG3).

Abreviaturas: ID – Identificación; NJ – *Neighbor-joining*; UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*; NR – No Realizado; SNP - Polimorfismo de nucleótido simple. Las discrepancias se muestran sombreadas en color rojo. * Linaje 4 y sub-linaje sin clasificar (ninguno de los sub-linajes estudiados fue positivo); “-” No asignado.

ID	Especie	Fuente de obtención del linaje			Tipado de SNP
		MIRU-VNTR 24 loci			
		Búsqueda por similitud	Identificación basada en árbol filogenético		
NJ	UPGMA				
CHGUV026	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3
CHGUV027	<i>M. tuberculosis</i>	LAM	LAM	LAM	L4.3
CHGUV028	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2
CHGUV029	<i>M. tuberculosis</i>	URAL	URAL	URAL	L4.2
CHGUV030	<i>M. tuberculosis</i>	-	Haarlem	Haarlem	L4.1.2
CHGUV031	<i>M. tuberculosis</i>	TUR	TUR	TUR	L4.2
CHGUV033	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2
CHGUV036	<i>M. tuberculosis</i>	-	Haarlem	Haarlem	L4.1.2
CHGUV038	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2
CHGUV039	<i>M. tuberculosis</i>	S	S	S	L4.4
CHGUV048	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3
CHGUV049	<i>M. tuberculosis</i>	-	Haarlem	Haarlem	L4.1.2
CHGUV050	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.10
CHGUV055	<i>M. tuberculosis</i>	-	Delhi/CAS	Delhi/CAS	L3
CHGUV056	<i>M. tuberculosis</i>	LAM	LAM	LAM	L4.3
CHGUV058	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2
CHGUV060	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	LAM	L4.3
CHGUV062	<i>M. tuberculosis</i>	LAM	LAM	LAM	L4.3
CHGUV067	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.10
CHGUV070	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.10
CHGUV071	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3
CHGUV072	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	-	L4.10
CHGUV075	<i>M. tuberculosis</i>	-	EAI	EAI	L1
CHGUV078	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3
CHGUV082	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3
CHGUV084	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3
CHGUV088	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2
CHGUV091	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.10
CHGUV093	<i>M. tuberculosis</i>	URAL	URAL	URAL	L4.2
CHGUV096	<i>M. tuberculosis</i>	S	S	S	L4.4
CHGUV097	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.10
CHGUV098	<i>M. tuberculosis</i>	Cameroon	Cameroon	Cameroon	L4.6.2
CHGUV099	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3
CHGUV100	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3

Apéndice documental

ID	Especie	Fuente de obtención del linaje				Tipado de SNP
		MIRU-VNTR 24 loci				
		Búsqueda por similitud	Identificación basada en árbol filogenético			
			NJ	UPGMA		
CHGUV103	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.10	
CHGUV108	<i>M. bovis</i> BCG	-	Bovis	Bovis	Bovis	
CHGUV111	<i>M. tuberculosis</i>	LAM	LAM	LAM	L4.3	
CHGUV112	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3	
CHGUV115	<i>M. tuberculosis</i>	LAM	LAM	LAM	L4.3	
CHGUV118	<i>M. tuberculosis</i>	-	Cameroon	Cameroon	L4.6.2	
CHGUV119	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.10	
CHGUV123	<i>M. tuberculosis</i>	-	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV124	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	LAM	L4.3	
CHGUV129	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV130	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV131	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV132	<i>M. tuberculosis</i>	LAM	LAM	LAM	L4.3	
CHGUV133	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV136	<i>M. tuberculosis</i>	-	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV137	<i>M. tuberculosis</i>	-	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV140	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.10	
CHGUV142	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3	
CHGUV143	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4*	
CHGUV145	<i>M. tuberculosis</i>	-	NEW-1	UgandaI	L4*	
CHGUV146	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV149	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.10	
CHGUV152	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.10	
CHGUV153	<i>M. tuberculosis</i>	-	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV154	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV156	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3	
CHGUV157	<i>M. tuberculosis</i>	EAI	EAI	EAI	L1	
CHGUV160	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.10	
CHGUV163	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3	
CHGUV168	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.10	
CHGUV172	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3	
CHGUV177	<i>M. tuberculosis</i>	-	NEW-1	NEW-1	L4.4	
CHGUV186	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV187	<i>M. tuberculosis</i>	-	NEW-1	NEW-1	L4.4	
CHGUV188	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3	
CHGUV190	<i>M. tuberculosis</i>	-	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV191	<i>M. tuberculosis</i>	-	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV194	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3	
CHGUV196	<i>M. tuberculosis</i>	-	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV197	<i>M. tuberculosis</i>	-	Ghana	Ghana	L4.1.1	
CHGUV202	<i>M. tuberculosis</i>	-	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV203	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.10	
CHGUV205	<i>M. tuberculosis</i>	-	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV206	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV207	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3	
CHGUV210	<i>M. tuberculosis</i>	-	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV211	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV212	<i>M. tuberculosis</i>	-	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV213	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV214	<i>M. tuberculosis</i>	-	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	

ID	Especie	Fuente de obtención del linaje				Tipo de SNP
		Búsqueda por similitud	MIRU-VNTR 24 loci		Identificación basada en árbol filogenético	
			NJ	UPGMA		
CHGUV215	<i>M. tuberculosis</i>	-	S	S	L4.4	
CHGUV216	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV217	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.10	
CHGUV221	<i>M. tuberculosis</i>	-	Cameroon	Cameroon	L4.6.2	
CHGUV228	<i>M. tuberculosis</i>	-	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV229	<i>M. tuberculosis</i>	-	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV230	<i>M. tuberculosis</i>	-	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV231	<i>M. tuberculosis</i>	-	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV233	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.10	
CHGUV236	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.10	
CHGUV269	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV272	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3	
CHGUV278	<i>M. tuberculosis</i>	-	S	S	L4.4	
CHGUV280	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV298	<i>M. tuberculosis</i>	-	S	S	L4.4	
CHGUV305	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV331	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV332	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV336	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2	
CHGUV_H37Ra	<i>M. tuberculosis</i>	H37Rv	H37Rv	H37Rv	NR	
ICHGUV125	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2.1	
ICHGUV126	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.8	
ICHGUV127	<i>M. tuberculosis</i>	-	S	S	L4.4.1.2	
ICHGUV128	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3.3	
ICHGUV129	<i>M. tuberculosis</i>	Delhi/CAS	Delhi/CAS	Delhi/CAS	L3.1.2.1	
ICHGUV130	<i>M. tuberculosis</i>	-	Haarlem	Haarlem	L4.1.2.1	
ICHGUV135	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.7	
ICHGUV137	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3.2	
ICHGUV245	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3.2	
ICHGUV247	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2.1	
ICHGUV249	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2.1	
ICHGUV250	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3.3	
ICHGUV251	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2.1	
ICHGUV255	<i>M. tuberculosis</i>	-	Haarlem	Haarlem	L4.1.2.1	
ICHGUV538	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3.4.2	
ICHGUV545	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.8	
ICHGUV839	<i>M. tuberculosis</i>	LAM	LAM	LAM	L4.3.3	
ICHGUV846	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2.1	
ICHGUV848	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3.4.2	
ICHGUV850	<i>M. tuberculosis</i>	LAM	LAM	LAM	L4.3.3	
ICHGUV1000	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2.1	
ICHGUV1008	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.8	
ICHGUV1011	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.8	
ICHGUV1012	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2.1	
ICHGUV1015	<i>M. tuberculosis</i>	LAM	LAM	LAM	L4.3.3	
ICHGUV1449	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.8	
ICHGUV1590	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2.1	
ICHGUV246	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.8	

Apéndice documental

ID	Especie	Fuente de obtención del linaje				Tipado de SNP
		MIRU-VNTR 24 loci				
		Búsqueda por similitud	Identificación basada en árbol filogenético			
NJ	UPGMA					
ICHGUV253	<i>M. tuberculosis</i>	-	-	-	L4.4.2	
ICHGUV256	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2.1	
ICHGUV525	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.8	
ICHGUV536	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.7	
ICHGUV548	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.8	
ICHGUV549	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3.3	
ICHGUV838	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2.1	
ICHGUV851	<i>M. tuberculosis</i>	Cameroon	Cameroon	Cameroon	L4.6.2.2	
ICHGUV854	<i>M. tuberculosis</i>	-	Beijing	Beijing	L2.2.1	
ICHGUV856	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.8	
ICHGUV860	<i>M. tuberculosis</i>	-	Haarlem	Haarlem	L4.1.2.1	
ICHGUV861	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3.4.2	
ICHGUV862	<i>M. tuberculosis</i>	Beijing	Beijing	Beijing	L2.2.1	
ICHGUV863	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3.2	
ICHGUV868	<i>M. tuberculosis</i>	-	LAM	LAM	L4.3.2	
ICHGUV994	<i>M. tuberculosis</i>	-	EAI	EAI	L1.2.2	
ICHGUV995	<i>M. tuberculosis</i>	-	S	S	L4.4.1.1	
ICHGUV1002	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.8	
ICHGUV1009	<i>M. tuberculosis</i>	-	S	H37Rv	L4.4.1.1	
ICHGUV1010	<i>M. tuberculosis</i>	Haarlem	Haarlem	Haarlem	L4.1.2.1	
ICHGUV1452	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.3.2	
ICHGUV1458	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.8	
ICHGUV1459	<i>M. tuberculosis</i>	-	H37Rv	H37Rv	L4.7	

Apéndice XII: Comparación WGS respecto a MIRU-VNTR 24 loci

Comparación de la técnica MIRU-VNTR 24 loci respecto a la WGS. Datos pareados con las diferencias existentes entre las 55 cepas estudiadas: variación de SNP (WGS) respecto a la variación de loci (MIRU-VNTR 24). El sombreado de los puntos es proporcional a la frecuencia de dichos datos pareados.

