



Universidad de Alcalá

Universidad de Alcalá

Departamento de Biomedicina y Biotecnología
Programa Biología Funcional y Biotecnología

Tesis Doctoral

**Nuevas aproximaciones de vigilancia de la transmisión de
Mycobacterium tuberculosis en entornos comunitarios
complejos y de otros patógenos relevantes en el entorno
nosocomial**

Para optar al grado de doctor, presentada por

Fermin Acosta Garcia

Dirigida por:

Dr. Darío García de Viedma del Álamo

Dra. Laura Pérez García

“Mi consejo a los estudiantes de ciencia es que, si desean ardientemente investigar, deberían hacerlo por todos los medios. Nada debería interponerse al deseo intenso de dedicar la vida a la Ciencia. Si tienes el anhelo de llevar a cabo investigación científica adquiere el aprendizaje preciso y por todos los medios hazlo. Difícilmente alguna otra cosa te dará tanta satisfacción y, sobre todo, tal sentido de logro.”

Severo Ochoa

Agradecimientos y Dedicatoria

Son muchas las cosas que tengo que agradecer. Agradecimientos a aquellas personas que me han ayudado durante el desarrollo de la tesis, cuando un estudiante se embarca en realizar un trabajo así, familiares, amigos, compañeros, e incluso desconocidos llegan a formar parte del trabajo para poder lograr el objetivo, dado que trabajos de estas características no se pueden realizar solo.

En primer lugar, le agradezco a mis padres, desde el primer momento que escogí la carrera, no dudaron en darme su apoyo incondicional dándome a entender que es la única manera que tenemos para crecer como personas y desarrollarnos profesionalmente. Mis padres, hermanas y hermanos, mis abuelas y abuelos, que, a pesar de la distancia, me habéis socorrido en consejos, oraciones y críticas que me han ayudado y que le debo todo a ustedes.

Le agradezco a los profesores de la Universidad Santo Tomas de Chile (Chile) y al Doctor Renato Chávez por inculcarme el espíritu científico e investigador desde mis inicios en la carrera de Biotecnología. Agradecer a Amador Goodridge, por el apoyo constante en realizar investigación científica, un apoyo que sin duda me permitió crecer como persona y amar la investigación científica sobre la tuberculosis, un aporte que sin duda me ayudó a conseguir contactos y salir de mi país para hacer mi doctorado en Madrid, España.

Siento una enorme gratitud a Darío Garcia de Viedma y a Laura Pérez por apoyarme desde mis inicios para organizar y hacer mi tesis doctoral en el Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM) para que yo estuviese cómodo, ofreciéndome un apoyo constante para que mis trabajos se realizaran de la mejor manera. Además, por extenderme la mano en los momentos complicados durante mi carrera predoctoral. Al igual, que a mi tutor de tesis Manuel Hernández, por su sencillez, apoyo y disposición en cualquier cosa que necesitara tanto académica como personal.

Agradezco a todos mis compañeros (as) del laboratorio de HGUGM, que en todo momento me ayudaron a desenvolverme en el grupo y a que no me sintiera solo durante mi estancia. A Marta, por su sencillez y disposición para realizar transferencia de conocimiento sobre el manejo de muestras biológicas (micobacterias) y técnicas moleculares. A Estefanía, por su amabilidad y ayuda en el analisis de los resultados. Su uso de los métodos de analisis de datos y creatividad en la presentación de trabajo a nivel

de congresos me influenciaron en la adecuación de mi trabajo. Agradecer a Sandra, por su compañerismo y apoyo para archivar las muestras y organizar el trabajo experimental en el laboratorio. Además, a Pedro y Ana, aunque estuvieron poco tiempo en el laboratorio, siempre me animaron durante mi etapa investigadora y me transmitieron su compañerismo. A María Jesús, por compartir con nosotros en todo momento, un pequeño espacio en su laboratorio de micobacterias para llevar a cabo los trabajos experimentales. Agradecer a Miguel Martínez por su constante apoyo colaborativo en el grupo de investigación. A Rocío, que tan amablemente me preparaba los trámites de documentos y todo lo necesario para los congresos y estancias fuera del laboratorio. Por último, agradecer a todos los integrantes del grupo de investigación ERANet-LAC, liderado por Darío y apoyado por: Amador Goodridge, Dilcia Sambrano, Viviana Ritacco, Andrea Cabibbe, Christophe Sola, Juan Agapito, Eduardo Gotuzo, que con entusiasmo y energía han sido capaces de mover actividades relacionadas con el proyecto en cada nodo de trabajo. Agradecer a todas aquellas personas que de una u otra manera me han animado y ayudado durante mi carrera investigativa, gracias, porque me han hecho sentir muy importante.

Pero sobre todo quiero agradecer y dedicar esta tesis a mi director de tesis Darío García de Viedma. Esta tesis es más suya que mía, él fue el responsable en ofrecermé un pequeño espacio en su grupo de trabajo para que pudiera entrar a formar parte de su equipo de trabajo, incluirme en sus proyectos y recopilar los datos necesarios para llevar a cabo mi trabajo doctoral. Darío me ofreció el trabajo y se aseguró día tras día de que avanzase para cumplir con los tiempos y la culminación de este trabajo. Lo mejor que se puede dar a alguien es su tiempo y apoyo, aunque a veces uno sienta presión, es necesario, la única manera de poder dar el máximo de uno mismo para llegar a la meta. Por esto, esta dedicatoria de tesis a mi director, un amigo a quien dedico este trabajo.

Índice de contenidos

Índice de contenidos

Resumen / Summary	1
Introducción	11
Capítulo I. Transmisión de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en entornos comunitarios complejos	13
1. La Tuberculosis	13
1.1. Origen y descripción histórica.....	13
1.2. Diversidad genética del Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
2. Aspectos generales de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	19
2.1. Transmisión, inmunidad y patogenia	19
2.2. Formas de presentación clínica	21
2.2.1. Tuberculosis pulmonar	21
2.2.2. Tuberculosis extrapulmonar	22
2.3. Factores implicados en la enfermedad	22
3. Diagnóstico y tratamiento de MTB	23
3.1 Diagnóstico inmunológico	24
3.1.1. Prueba de la Tuberculina	24
3.1.2. Prueba de interferón gamma (IFN- γ).....	25
3.2. Diagnóstico microbiológico	25
3.2.1. Análisis microscópico (baciloscopia)	26
3.2.2. Cultivo bacteriológico	26
3.2.2.1. Métodos de sensibilidad antibiótica	27
3.3. Diagnóstico molecular.....	28
3.3.1 Métodos de hibridación	28
3.3.2 Métodos basados en PCR	29
3.3.2.1. Ensayo GenXpert	29
4. Tratamiento	30
4.1. Fármacos de primera línea	31
4.2. Fármacos de segunda línea	31
4.3. Nuevos fármacos antituberculosos	32

5. Epidemiología de la tuberculosis.....	34
5.1. Epidemiología clásica. Estudio convencional de contactos.	35
5.2. Epidemiología molecular.....	36
5.2.1. Técnicas de tipado molecular.....	36
5.2.1.1 Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción: RFLP-IS6110	36
5.2.1.2. Espoligotipado	37
5.2.1.3. MIRU-VNTR.....	38
5.3. Epidemiología genómica: Secuenciación de genoma completo (WGS)	41
5.4. Herramientas epidemiológicas alternativas	43
5.5. Aportaciones de la epidemiología molecular y genómica	46
5.5.1. Vigilancia de cadenas de transmisión	46
5.5.2. Estudio de eventos de contaminación cruzada	49
5.5.3. Genotipado de cepas para el estudio de recurrencias	50

Capítulo II. Transmisión de patógenos relevantes en el entorno nosocomial

.....	53
1. Patógenos relevantes en el entorno nosocomial.....	53
1.1. Problema global.....	53
1.2. Infección nosocomial por <i>Mycobacterium chimaera</i>	58
1.2.1. Aspectos generales del microorganismo.....	58
1.2.2. Emergencia global por infecciones por <i>M. chimaera</i>	59
1.2.2.1. Descripción del evento	59
1.2.2.2. Caracterización detallada de los aislados del brote.....	60
1.2.2.3. Epidemiología de las infecciones por <i>M. chimaera</i> asociadas a HCUs	62
1.3. Infección nosocomial por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	64
1.3.1. Aspectos generales del microorganismo.....	64
1.3.2. Resistencia antimicrobiana	65
1.3.3. Infección por <i>P. aeruginosa</i>	66

1.3.4. Caracterización molecular.....	66
1.3.4.1. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).....	67
1.3.4.2. Análisis del número variable de repeticiones en tándem en múltiples loci (MLVA).....	68
1.3.4.3. Tipado mediante secuenciación de múltiples loci (MLST).....	68
1.3.4.4. Secuenciación de genoma completo (WGS).....	69
Justificación y Organización.....	71
Objetivos.....	77
Objetivo General.....	79
Objetivos Específicos.....	79
Capítulo I. Transmisión de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en entornos comunitarios complejos.....	81
1. Exportation of MDR TB to Europe from setting with actively transmitted persistent strains in Peru.....	83
2. Simplified Model to Survey Tuberculosis Transmission in Countries without Systematic Molecular Programs.....	87
3. WGS reveals a likely long-term prevalent status for a predominant Beijing strain in Colon, Panama.....	95
Capítulo II. Transmisión de patógenos relevantes en el entorno nosocomial.....	105
4. Fast update of undetected <i>Mycobacterium chimaera</i> infections to reveal unsuspected cases.....	107
5. In-Depth Study of a Nosocomial Outbreak Caused by Extensively Drug-Resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Using Whole Genome Sequencing Coupled With a Polymerase Chain Reaction Targeting Strain-Specific Single Nucleotide Polymorphisms.....	113

Discusión	123
1. Transmisión intercontinental de tuberculosis MDR como consecuencia de los movimientos migratorios internacionales.....	126
2. Evaluación de alternativas para la vigilancia epidemiológica de TB en entornos complejos carentes de sistemas de genotipado sistemático	130
2.1 Panamá como modelo de estudio.....	131
2.2 Descripción de la estrategia y experiencia previa	133
2.3 Adaptación de la estrategia de vigilancia alternativa en Panamá	134
3. Cepa Beijing predominante en la provincia de Colón, Panamá.....	138
3.1 Descripción del evento y análisis comparativo.....	138
3.2. Caracterización genómica, estudio filogenético y reconstrucción histórica	141
4. Transmisión de patógenos relevantes en el entorno nosocomial	146
4.1. <i>Mycobacterium chimaera</i> como modelo de infección nosocomial de impacto global.....	147
4.1.1. Identificación de <i>M. chimaera</i> en muestras clínicas y ambientales por PCR en tiempo real.	148
4.1.2. Análisis genómico de <i>M. chimaera</i>	150
4.2. Estudio de infección nosocomial por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> como modelo de un nuevo modo de manejo de brotes.	152
4.2.1. Descripción del evento	154
4.2.2. Caracterización genómica del brote	155
4.2.3 Abordaje alternativo del estudio del brote.....	157
Conclusiones	161
Abreviaturas	167
Referencias	171

Resumen / Summary

Resumen

La aplicación de estrategias de caracterización molecular ha transformado el modo en el que abordamos el conocimiento de las dinámicas de transmisión de microorganismos patógenos. La reciente introducción del análisis genómico ha supuesto una segunda revolución en la capacidad de discriminación entre cepas y en la precisión en la que podemos abordar los estudios epidemiológicos. Sin embargo, son necesarios nuevos esfuerzos para definir el modo más adecuado de integrar las aproximaciones moleculares y genómicas y adaptarlas a diferentes retos epidemiológicos y entornos de análisis.

Con este fin, en esta tesis se han definido dos bloques de trabajo, atendiendo a infecciones i) de carácter comunitario, seleccionando a *Mycobacterium tuberculosis* como patógeno representativo y de alta relevancia global y ii) de naturaleza nosocomial, enfocándonos en *Mycobacterium chimaera*, como microorganismo responsable del problema emergente derivado de la exposición a dispositivos sanitarios contaminados, y en *Pseudomonas aeruginosa* MDR, microorganismo de gran relevancia en brotes que implican transmisión persona-persona.

Cualquier intento de optimizar los sistemas de vigilancia de la transmisión de la tuberculosis (TB) deben enfrentar el nuevo escenario global de la enfermedad, como resultado de los movimientos migratorios internacionales. Siguiendo esta premisa, abordamos la caracterización de la transmisión de TB de alto riesgo, TB-multirresistente, en uno de estos ejes migratorios, el que incluye Latinoamérica y Europa. Nuestra investigación comenzó caracterizando mediante MIRU-VNTR una muestra de cepas MDR circulantes en Lima, Perú, que reveló una elevada tasa de transmisión reciente en esa población. La comparación de esos genotipos con los identificados en cepas circulantes en población migrante de Perú en Europa identificó cepas coincidentes en Italia y España. El análisis genómico determinó con precisión la existencia de dos eventos de exportación intercontinental de TB-MDR

desde Perú a Europa, que implicaban a dos variantes de cepas circulantes en Lima, y que una de ellas había sido responsable de una transmisión activa posterior en Florencia.

El estudio integrado entre Perú y Europa reveló la necesidad de contar con datos genotípicos de las cepas circulantes de MTB que permitieran abordar estudios transnacionales similares en otros entornos. Lamentablemente, son numerosos los países de origen de migrantes que carecen de sistemas de epidemiología molecular sistemática. De esta necesidad, y tratando de compensar la brecha de conocimiento existente entre los países de origen y destino de migración desarrollamos una estrategia alternativa basada en i) genotipado sistemático por MIRU-VNTR de una muestra de la población a analizar para identificar las cepas más prevalentes, ii) caracterización por secuenciación de genoma completo (WGS) de los clusters prevalentes para identificar SNPs marcadores de cepa y iii) desarrollo de PCRs específicas dirigidas a esas cepas, que optimizaran y simplificaran su vigilancia prospectiva a bajo coste.

La estrategia se pilotó en Panamá. El genotipado por MIRU-VNTR de una colección de cepas en dos provincias de Panamá (Panamá y Colón) reveló una alta proporción (50%) de aislados de MTB agrupados en cluster, con una distribución asimétrica de algunas cepas, predominantes, bien en Colón, bien en Panamá. El análisis por WGS de parte de estos clusters permitió evidenciar que únicamente uno de ellos correspondía a eventos de transmisión reciente, con aislados mostrando baja diversidad entre ellos, mientras que el resto correspondían a cepas prevalentes. El diseño de una serie de PCRs específicas permitió asegurar la vigilancia prospectiva in situ de estas cepas, responsables de un tercio del total de casos de TB de las poblaciones estudiadas.

Una de las cepas prevalentes en Colón correspondió al linaje Beijing. Debido a que este linaje se ha asociado a una elevada virulencia y transmisión, se realizó una actualización rápida de su presencia en Colón, apoyados en una PCR específica, lo que reveló que es responsable del 57% de los casos incidentes. El estudio integrado de los datos de WGS de todos los aislados identificados, junto con

los disponibles en bases de datos globales, permitió determinar que pertenece a un sublinaje Beijing moderno, la rama asiática africana 3 (Bmyc13, L2.2.5), y que su posible entrada a Panamá pudo ocurrir desde Vietnam, como indican los aislados más próximos filogenéticamente. El estudio de la diversidad acumulada por los representantes de esta cepa en Panamá permitió inferir que el período más probable para su entrada en el país fue entre los años 2000 y 2012.

Dada la rentabilidad en el estudio de la transmisión de TB de la aplicación de nuestra estrategia combinada de genotipado dirigido, WGS y desarrollo de PCRs específicas de cepas, era oportuno evaluar su transferibilidad al segundo área de interés de esta tesis, las infecciones nosocomiales. Para ello, replicamos el esquema de trabajo desarrollado para TB en la caracterización de un brote por *P. aeruginosa* XDR, que implicaba a 14 pacientes, que se estaba abordando con genotipado convencional (electroforesis de campos pulsados). El análisis por WGS y la consiguiente PCR específica de cepa dirigida a SNPs marcadores identificados en el estudio genómico, permitió descartar casos no relacionados, e identificar casos nuevos que no habían sido sospechados. Además, definió la existencia de brotes solapantes de menor dimensión, permitió determinar el verdadero caso índice, y finalmente, alertar de que el brote se mantenía aún activo en el momento del análisis.

Por último, dentro de nuestro interés de optimizar la vigilancia de transmisión nosocomial, y tras habernos enfocado en la modalidad de transmisión persona-persona, era oportuno atender a eventos que implicaban exposición a dispositivos sanitarios contaminados. La reciente alarma global derivada de la exposición de pacientes sometidos a cirugía cardíaca a dispositivos “Heater-cooler” (HCU) contaminados con *Mycobacterium chimaera* justificó nuestra atención sobre este segundo evento como modelo de estudio. Como respuesta, evaluamos la utilidad de aplicar una PCR en tiempo real para la identificación de *M. chimaera*, basada en el análisis genómico de sus secuencias específicas, con el fin de dar una doble respuesta para: i) optimizar la vigilancia ambiental prospectiva, directamente sobre las muestras de agua de los dispositivos HCU e ii) identificar retrospectivamente

casos infectados por este microorganismo que hubieran pasado desapercibidos. La estrategia mostró su utilidad para la identificación precoz de dispositivos HCU contaminados, permitiendo su monitorización y desveló la infección por *M. chimaera* en un paciente que había sido sometido a cirugía cardíaca en una institución diferente a la nuestra. El estudio por WGS del aislado del paciente y de los obtenidos de los dispositivos contaminados, permitió demostrar la participación de la cepa responsable del brote global.

Summary

The application of molecular strategies has transformed the way in which we approach the analysis of pathogenic microorganisms transmission dynamics. The recent introduction of genomic analysis has caused a second revolution in the ability to discriminate between strains and in the precision in which we can approach epidemiological studies. However, further efforts are needed to define the most suitable way to integrate molecular and genomic approaches and to adapt them to different epidemiological challenges and analytical settings.

With this aim, this thesis has been organized in two work packages, focusing on infections i) at the community setting, selecting *Mycobacterium tuberculosis* as a representative pathogen with a high global relevance, and ii) at the nosocomial context, selecting *Mycobacterium chimaera*, as a microorganism responsible for the emerging alarm derived from exposure to contaminated health-care devices, and MDR *Pseudomonas aeruginosa*, a relevant microorganism as responsible for outbreaks involving person-to-person transmission.

Any attempt to optimize tuberculosis (TB) transmission surveillance must face the new global scenario for this disease, as a result of international migratory movements. Following this premise, we approach the characterization of high-risk TB, multidrug-resistant TB, transmission in one of these migratory axes, the one involving Latin America and Europe. We started characterizing by means of MIRU-VNTR a sample of MDR circulating strains in Lima, Peru, which revealed a high rate of recent transmission in that population. The comparison of those genotypes with those identified circulating among the Peruvian migrant population in Europe identified shared strains in Italy and Spain. Genomic analysis accurately determined the existence of two intercontinental exportation events of MDR-TB, from Peru to Europe, involving two variants of circulating strains in Lima, one of them being responsible for a

subsequent active transmission in Florence

The integrated study between Peru and Europe revealed the need for acquiring genotypic data from circulating MTB strains, which would allow to perform similar transnational studies in other settings. Unfortunately, there are many countries of origin of migrants that lack systematic molecular epidemiology programs. From this limitation, and trying to compensate the knowledge gap between the host countries and the countries of origin of migrants, we designed an alternative strategy based on i) systematic genotyping by MIRU-VNTR of a sample from the population to be analyzed, in order to identify the most prevalent strains, ii) characterization by whole genome sequencing (WGS) of the prevalent clusters to identify strain-marker SNPs and iii) tailoring specific PCRs targeting those strains, which will optimize and simplify their prospective low-cost surveillance.

A pilot study for this strategy was run in Panama. A collection of strains from two Panama provinces (Panama and Colon) was genotyped by MIRU-VNTR, and revealed a high proportion (50%) of MTB clustered isolates, with an asymmetric distribution of some strains, predominant either in Colon or in Panama. The analysis by WGS of these clusters allowed us to determine that only one of them corresponded to recent transmission, with isolates showing low diversity among them, while the remaining corresponded to prevalent strains. The design of a set of specific PCRs made it possible to ensure prospective on-site surveillance of these strains, which were responsible for a third of all TB cases in the populations studied.

One of the prevalent strains in Colon corresponded to the Beijing lineage. Because this lineage has been associated with high virulence and transmission, a rapid update of its presence was carried out in Colon, supported by a specific PCR, revealing that it is responsible for 57% of all incident cases. The integrated study of the WGS data from all the isolates, with those available in global databases, made it possible to determine that it belongs to a modern Beijing sublineage, the African Asian branch 3 (Bmyc13, L2.2.5), being Vietnam

the most likely origin, as indicated by the phylogenetically closest isolates. The study of the diversity accumulated by this strain representatives in Panama allowed us to infer that 2000-2012 was the most likely period for its entrance to the country.

Given the cost-effectiveness shown by our combined strategy of directed genotyping, WGS and development of strain-specific PCRs, in the study of TB transmission, we pursued to evaluate its transference to the second area of interest of this thesis, nosocomial infections. With this aim, we replicated the work scheme developed for TB, now for the characterization of an XDR *P. aeruginosa*, involving 14 patients, which had been approached only by conventional genotyping (pulsed field electrophoresis). The analysis by WGS and the consequent strain-specific PCR targeting strain-marker SNPs identified from the genomic analysis, allowed us to rule out unrelated cases and to identify another new cases that had not been suspected. In addition, it defined the existence of overlapping outbreaks of a smaller magnitude, identified the true index case, and finally, alerted that the outbreak was still active at the time of analysis.

Finally, due to our interest in optimizing nosocomial transmission surveillance, and after having focused on an example of person-person transmission, it was appropriate to focus on other events involving exposure to contaminated health-care devices. The recent global alarm caused by the exposure of patients undergoing cardiac surgery to “heater-cooler” (HCU) devices contaminated with *Mycobacterium chimaera* justified our attention on this second event as a study model. We evaluated the usefulness of applying a real-time PCR. based on the genomic identification of specific *M. chimaera* sequences, for the fast identification of this bacteria, in order to assure a double response to: i) optimize prospective environmental monitoring, analyzing directly water samples from the HCU devices and ii) retrospectively identify cases infected by this microorganism that would have gone unnoticed. The strategy showed its usefulness for the early identification of contaminated HCU

devices, allowing their monitoring and revealed *M. chimaera* infection in a patient who had undergone cardiac surgery in an institution different from ours. The WGS study of this patient isolate and of those obtained from the contaminated devices, allowed us to demonstrate the involvement of the strain responsible for the global outbreak.

Introducción

Capítulo I. Transmisión de *Mycobacterium tuberculosis* en entornos comunitarios complejos

1. La Tuberculosis

1.1. Origen y descripción histórica

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada por diferentes especies del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), de sus 8 miembros, *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) es el principal responsable de la enfermedad en humanos. A mediados del siglo XVII ya se especulaba que un tubérculo era el causante de la enfermedad, pero no fue hasta finales del siglo XIX cuando se conoció con certeza el microorganismo responsable, en 1882 el médico e investigador Robert Koch hizo la primera descripción del bacilo responsable de todas las formas de TB [1].

La TB ha sido, históricamente, una de las principales causas de muerte en todo el mundo. El avance del desarrollo económico y social supuso una mejora en las condiciones de vivienda, higiene y nutrición de la población, que condujo a la disminución de los casos (1-2% por año) y de las muertes debidas a la TB en Europa, Norteamérica y otros países del mundo [2]. En 1921, se desarrolló la primera vacuna para prevenir la infección por MTB (BCG; Bacille Calmette Guérin). Su grado de eficacia fue analizado, inicialmente, en niños entre los años 1927-1930. En un estudio realizado en Suecia en 4009 niños vacunados, la mortalidad de TB se redujo a 2.3%, mientras que en los niños no vacunados la tasa de mortalidad fue notablemente mayor, en torno al 9.6% [3]. Se trata de una vacuna que ha generado mucha polémica a lo largo de sus casi 100 años de historia, debido a que los resultados de eficacia obtenidos varían en función del país y la población diana de los estudios realizados. Con el tiempo se ha ido demostrando que su eficacia disminuye con la edad, por lo que presenta baja protección en el adulto, además, se ha descrito que protege mayoritariamente de las formas diseminadas de la TB y que tiene menos cobertura frente a las formas pulmonares. A pesar de esto, no

Introducción

existe en el mercado ninguna vacuna de mayor eficacia, por tanto, todavía en muchos entornos se sigue utilizando la BCG como vacuna preventiva contra la TB. En la actualidad, hay varias vacunas en desarrollo, algunas prometedoras y en fases clínicas bastante avanzadas, como MTBVAC (de la Universidad de Zaragoza, España) [4].

La introducción de los primeros fármacos contra la TB entre 1945-1952 permitió la implementación de nuevos regímenes de tratamiento combinado de muy larga duración. La poca eficacia de estos primeros fármacos condujo al desarrollo e integración de nuevos agentes terapéuticos (1952-1966) que mejoraron notablemente las tasas de curación, disminuyendo el número de recaídas, por debajo del 2% y reduciendo significativamente el tiempo de tratamiento (de 24 a 6 meses) [5]. Los resultados de este nuevo régimen de tratamiento fueron tan alentadores que se llegó a especular con la erradicación total de la TB en un período relativamente corto de tiempo. Sin embargo, a finales del siglo XX tuvo lugar el resurgimiento de la TB con un incremento del número de casos en todo el mundo debido a diferentes factores como la emergencia de las resistencias a fármacos (por la falta de adherencia al tratamiento), la aparición del VIH, los brotes en entornos cerrados (refugios y prisiones), los movimientos poblacionales y las carencias en los programas de control. La suma de estos componentes cambió las características clínicas, la dinámica y la epidemiología de la TB en grandes ciudades del mundo [6]. En 1992 el número de casos de TB registrados en la ciudad de Nueva York (EE. UU) llegó a representar el 14% los casos del país [6, 7]. En Londres en 1998, se observó un incremento de hasta un 71% del total de casos de TB, fundamentalmente entre pacientes coinfectados con VIH e inmigrantes procedentes de países de alta prevalencia [8]. Además, se observó un aumento en la tasa de nuevos casos de TB resistente a fármacos en diferentes partes del mundo como en Estonia (14.1%), China (10.8%) y Letonia (9.0%) [5]. En los últimos años gracias a la introducción de nuevos sistemas de diagnóstico y de detección de resistencias,

la implementación de programas de vigilancia y la mayor adherencia al tratamiento debido a la aplicación de DOTS (Sistema de Tratamiento por Observación Directa) se ha reducido sustancialmente esta tendencia, con una disminución histórica de hasta un 10% por año en algunos países (China, Camboya, Inglaterra y Gales, Países Bajos) [9].

Actualmente, el último informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [10] estima que 10 millones de personas enfermaron de TB en el año 2018, una cifra que se ha mantenido relativamente estable en los últimos años. La carga de morbilidad varía enormemente entre países, con un promedio mundial de alrededor de 130 casos por 100,000 habitantes/año (Figura 1) [10]. A pesar de que la incidencia de TB ha disminuido levemente en el mundo (1.5% al año), suficiente para alcanzar los objetivos e hitos de la OMS para 2030, que persiguen reducir la

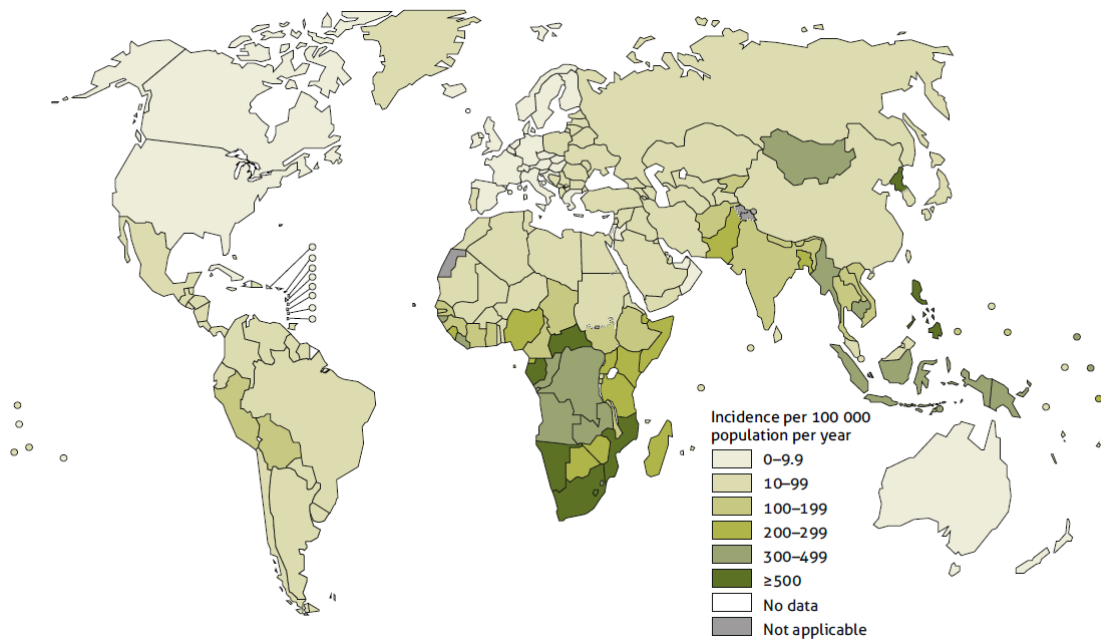


Figura 1. Incidencia estimada de tuberculosis en el mundo en el año 2018. (WHO: Global Tuberculosis Report 2019) [10].

tasa de incidencia de TB un 80% y el número de muertes un 90% con respecto a 2015. Se deben seguir reforzando las medidas de vigilancia y control para disminuir significativamente estas cifras y tratar de acercarse a los objetivos planteados [10, 11].

1.2. Diversidad genética del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

El Complejo *Mycobacterium tuberculosis* está formado por un grupo de especies bacterianas que comparten entre sí el 99% de identidad genética, la principal diferencia entre los miembros del complejo está relacionada con la adaptación al huésped primario, ya sea humano o animal [12]. Los análisis filogenéticos de las micobacterias que infectan a humanos demuestran que los distintos linajes proceden de un mismo ancestro común y que están distribuidos en distintas regiones geográficas. El MTBC que comprende 7 linajes adaptados a humano (*M. tuberculosis*), incluyendo, además, a *M. canettii*, como ancestro de origen común de las especies del complejo. Entre las especies del MTBC adaptadas a animales están: *M. bovis* (ganado), *M. caprae* (ovejas y cabras), *M. microti* (topillos) y *M. pinnipedii* (focas y leones marinos) (Figura 2) [12, 13].

Inicialmente se pensaba que los humanos habían adquirido la TB durante la época del Neolítico a partir de la domesticación del ganado, sugiriendo que *M. tuberculosis* provenía de *Mycobacterium bovis*. Sin embargo, actualmente gracias a los análisis genómicos se ha podido demostrar que es lo contrario. *M. bovis* ha perdido varios genes que todavía están presentes en *M. tuberculosis*, por lo que las especies adaptadas al hombre son anteriores y más antiguas que *M. bovis*. El origen común y la marcada distribución geográfica de las cepas del MTBC sugiere que estas bacterias podrían haber acompañado al humano en su migración y posteriormente diversificarse en la población [14, 15].

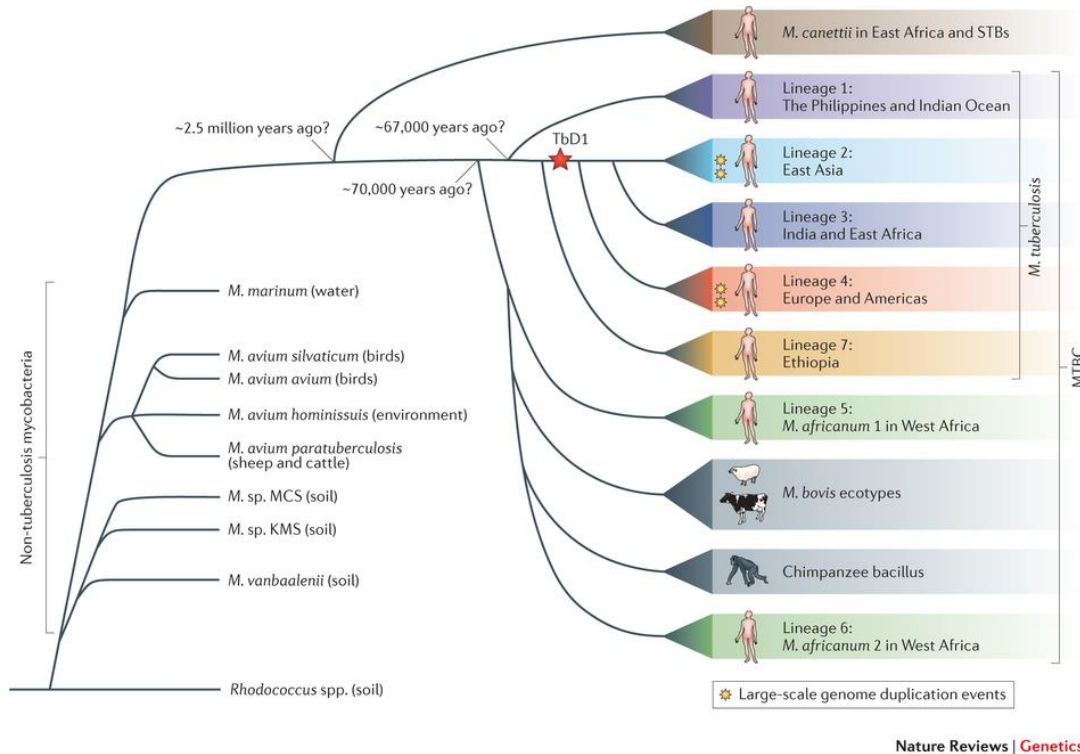


Figura 2. Relaciones evolutivas entre miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. (Galagan, 2014: Genomic insights into tuberculosis) [13].

La distribución filogenética divide los linajes de MTB en 2 grupos (Figura 3):

- 1) Grupo de cepas “ancestrales o antiguas”, que incluye los linajes 1 (Indo-Oceánico), 5 y 6 de *Mycobacterium africanum* (oeste de África) y el linaje 7 (Etiopía). Dentro de este grupo, el linaje 1 parece ser el más antiguo respecto a los otros.
- 2) Grupo de cepas “modernas” que incluye tres linajes: el linaje 4 (Euro-Americano), el linaje 2 (este asiático) y el linaje 3 (este de África y Asia central). Los linajes 2, 3 y 4 comparten todos ellos una misma delección, TbD1. Las cepas de los linajes modernos son más virulentas que las de los linajes antiguos. Los linajes 2 y 4 son responsables de la mayoría de los casos de TB y de los brotes de TB-MDR en el mundo, lo que sugiere una mayor capacidad de éxito evolutivo y una mejor adaptación a diferentes poblaciones humanas [12, 16-20].

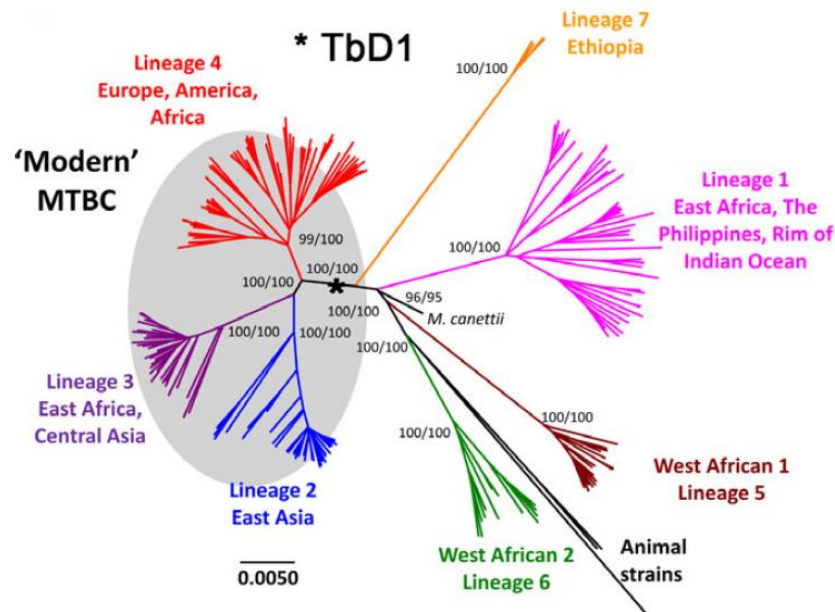


Figura 3. Análisis filogenético de 220 cepas del MTBC (Brites & Gagneux, 2015: Co-evolution of *M. tuberculosis* and *Homo sapiens*) [16].

El linaje 2 (familia de Asia oriental, principalmente de Beijing) se asocia a cepas de alta transmisibilidad, resistencia y virulencia [21]. La familia Beijing predomina en Asia oriental y sudoriental y en los países de la antigua Unión Soviética[18, 21]. Se estima que las cepas de la familia Beijing representan aproximadamente el 50% de las cepas del este de Asia y al menos el 13% de las cepas en todo el mundo [22].

En América, la prevalencia del genotipo Beijing varía ampliamente (<10% del total de casos), aunque en algunos entornos de Estados Unidos se han llegado a reportar ~ 25% de los casos [18], el 9% en Perú, el 2.15% en México, el 0.12% en Brasil y el 0.5% en Paraguay [23].

En Europa occidental, el sublinaje Beijing es más común entre los pacientes inmigrantes con tuberculosis, de manera que, la proporción de casos de TB-Beijing puede reflejar la importancia de la inmigración en una determinada población. Los

inmigrantes llegaron a representar más del 50% de los casos de TB en Londres, los Países Bajos, Francia, Dinamarca y Suecia, en comparación a otros países con menor porcentaje de casos, Italia (25%), Austria (24%), Finlandia (8%) y España (4%) [24].

2. Aspectos generales de *Mycobacterium tuberculosis*

2.1. Transmisión, inmunidad y patogenia

La forma de transmisión habitual de MTB es a través de gotas de “Flugge”, gotitas diminutas en torno a 1 a 5 µm que los pacientes expulsan al hablar, toser o estornudar, siendo el huésped humano su reservorio natural [25]. El riesgo de infección tras la exposición está determinado por diferentes aspectos como el grado de infectividad de la fuente bacteriana, la cercanía de los contactos, el entorno en el que ocurre la exposición (ambientes cerrados, masificados o mal ventilados) y otros factores de riesgo del huésped como el estado del sistema inmune, alcoholismo y el consumo de drogas [26, 27].

El riesgo de adquirir TB aumenta cuando el tiempo de contacto es prolongado y con la demora en el diagnóstico de los casos transmisores, por tanto, es crucial acelerar el diagnóstico para interrumpir la transmisión y optimizar el tratamiento [28]. La mayor probabilidad de riesgo de contagio se da cuando los pacientes presentan alta carga bacilar en el esputo, con concentraciones mayores a 10^4 unidades formadoras de colonias (CFUs) y cuando muestran cuadros clínicos de TB pulmonar cavitada, endobronquial o laríngea [29, 30].

Tras la inhalación de los bacilos se pueden dar principalmente tres tipos de progresión: 1) eliminación de la infección, 2) TB latente o 3) TB activa. En el primer caso, el bacilo es eliminado por el sistema inmunitario y esto depende de la salud del individuo, del estado de su sistema inmunitario y de las comorbilidades asociadas [31]. En la mayor parte de las ocasiones, aunque la bacteria no sea completamente eliminada, la respuesta inmune del paciente es lo bastante eficaz

como para controlar la infección y, en torno al 90% de las personas infectadas nunca desarrollará la enfermedad clínica y permanecerá con el bacilo en estado quiescente toda su vida, es lo que se conoce como TB latente. En un pequeño porcentaje de los casos de TB latente se produce la reactivación de la bacteria y evoluciona a enfermedad activa [32]. En el tercer caso, los pacientes tras la exposición al bacilo desarrollan directamente la enfermedad. Al principio tiene lugar una etapa pre-activa, donde el paciente presenta una leve sintomatología subclínica, sin síntomas claros donde la baciloscopia del esputo puede ser negativa por la baja carga bacilar. Tras esta etapa, cuando la persona desarrolla la TB activa, la sintomatología clínica es clara con fiebre, tos y pérdida de peso. Siendo el diagnóstico más evidente en esputo, cultivo y en otras pruebas moleculares [31].

El sistema inmunitario juega un papel crucial durante la infección por TB. Cuando los bacilos alcanzan los alveolos pulmonares, son fagocitados por los macrófagos para tratar de evitar la progresión de la infección [31]. En este punto se producen 2 tipos de respuesta inmunitaria específica: una respuesta celular donde los macrófagos inducen la activación y la destrucción de los bacilos y otra respuesta humoral que genera un mecanismo de respuesta frente a los antígenos bacilares que destruyen los macrófagos inactivados que han fagocitado a los bacilos durante la infección. De esta manera, el sistema inmunitario puede controlar la progresión de la infección, pero cuando el sistema es descompensado por factores de inmunosupresión/morbilidad la infección progresa [31, 33]. La mayor respuesta celular está representada por la fagocitosis de *M. tuberculosis* mediada por macrófagos. Los mecanismos de resistencia de MTB en el macrófago ayudan al progreso de la infección, la bacteria es capaz de sobrevivir en el interior del fagosoma donde se replica y se multiplica causando la lisis del macrófago, facilitando la liberación de bacilos que aumentan el número de células en necrosis y generando lesiones granulomatosas [34].

Los pacientes con TB pulmonar activan que reciben esquemas terapéuticos eficaces durante un periodo de tiempo suficiente, normalmente, se curan de la enfermedad. Sin embargo, existe una proporción variable de estos pacientes que sufren recurrencias, desarrollando de nuevo tuberculosis. La recurrencia de la TB activa después del tratamiento de un episodio de enfermedad inicial puede ocurrir debido a una reactivación endógena (con la misma cepa) o a una reinfección exógena (con una cepa diferente). Las reactivaciones se deben principalmente a un mal manejo de la enfermedad, por la mala adherencia al tratamiento o por la administración incorrecta de los fármacos. En países con una incidencia baja o intermedia de TB, generalmente las recurrencias se deben a reactivaciones y suelen oscilar entre el 1.2 y 7.0%. Por el contrario, en países de alta incidencia, las recurrencias se dan en un 14% de los pacientes correctamente tratados y en su mayoría son debidas a nuevas infecciones, más que a reactivaciones de la enfermedad inicial [35, 36].

2.2. Formas de presentación clínica

Las manifestaciones clínicas de la TB son variadas e inespecíficas, ya que ningún signo o síntoma es exclusivo de la enfermedad. La aparición del cuadro clínico depende de diferentes factores del huésped, del agente infeccioso y de la interacción entre ambos (huésped-patógeno). La mayoría de las infecciones por TB se presentan como tuberculosis pulmonar, pero pueden existir también, con relativa frecuencia, otro tipo de manifestaciones extrapulmonares (ganglionares, gástricas, urinarias, etc) [37].

2.2.1. Tuberculosis pulmonar

La infección pulmonar se adquiere por vía aérea. La manifestación clínica suele ser en resultado de varias semanas de evolución, predominado los síntomas generales como fiebre, sudores fríos, pérdida de peso, anorexia, malestar y

debilidad. Puede aparecer dolor pleurítico, disnea e incluso insuficiencia respiratoria aguda. En la fase más evolucionada, normalmente, aparece tos, que evoluciona de tos seca a tos purulenta y, en ocasiones, presenta estrías de sangre en el esputo [37]. Cuando no se diagnostica a tiempo y se proporciona el tratamiento adecuado, puede provocar la muerte.

2.2.2. Tuberculosis extrapulmonar

Aparece tras la diseminación sanguínea de la bacteria y prácticamente todas las localizaciones anatómicas pueden verse afectadas, las más frecuentes son los ganglios linfáticos, la pleura, el aparato urinario, los huesos y articulaciones, las meninges, el peritoneo y el pericardio. La diseminación hematógena es más frecuente en pacientes coinfectados con VIH y, por eso, con mucha frecuencia presentan tuberculosis extrarrespiratorias. La tuberculosis en los ganglios linfáticos es la forma más común de tuberculosis extrapulmonar, en concreto los ganglios cervicales y supraclaviculares son los más frecuentemente afectados [38, 39].

2.3. Factores implicados en la enfermedad

Las personas infectadas por MTB con mayor riesgo de desarrollar la enfermedad tuberculosa pueden dividirse en dos grupos: 1) individuos infectados recientemente y 2) pacientes con condiciones clínicas que incrementan el riesgo de progresión.

En el primer grupo se incluyen contactos íntimos de pacientes con TB activa, conversores de tuberculina positiva (2 años previos), sobre todo en el primer año, inmigrantes recientes (< 5 años) de países con tasas altas de TB, niños en los primeros 2 años de vida y, en menor grado, adolescentes y jóvenes. Otros factores que aumentan el riesgo de infección son el tiempo en prisión, el acceso a atención médica o los viajes prolongados en áreas de alto riesgo. La mayor parte de la TB se observa en poblaciones adultas, el riesgo aumenta con la edad.

En el segundo grupo se incluyen pacientes infectados por VIH, pacientes con TB previa o lesiones fibróticas no tratadas, individuos con déficit ponderal superior al 5%, diabetes, abuso de drogas, pacientes tratados con fármacos inhibidores del factor de necrosis tumoral (TNF), corticoides, inmunodepresores y otras complicaciones clínicas [29].

3. Diagnóstico y tratamiento de MTB

El diagnóstico precoz de la TB es crucial para el tratamiento adecuado del paciente y la contención de la transmisión. La mejora en la identificación de la infección por MTB, incluyendo la TB latente, la TB activa y la farmacorresistencia, tiene un profundo efecto en la salud pública. Existen métodos de diagnóstico que permiten la detección de la infección de la TB latente (pruebas inmunológicas) y de la enfermedad de activa (baciloscopia, cultivo y pruebas moleculares).

El diagnóstico de la TB latente es muy retador debido a la clínica asintomática del paciente. El primer rastreo de la infección de pacientes con TB latente se basa en la detección de la respuesta inmune a MTB, normalmente, se emplea la prueba de tuberculina o Mantoux [40]. Otro test comercial disponible es la prueba del Interferón gamma (IFN- γ) conocida bajo el acrónimo de IGRA (*Interferon-gamma-release assays*), se trata de una prueba diagnóstica *in vitro* a partir de muestras de sangre heparinizada de los pacientes [41]. Un resultado positivo de alguna de estas pruebas, sólo indica que la persona ha sido infectada con MTB, pero no pueden precisar si se encuentra de forma latente o si ha sido completamente eliminado por el sistema inmunitario, por tanto, son los criterios médicos y clínicos los que determinan si el paciente debe iniciar un tratamiento preventivo, que suele consistir en 6-9 meses con isoniacida.

Para el diagnóstico de la tuberculosis activa se emplean pruebas radiológicas, la identificación del bacilo en muestra clínica y el aislamiento de la bacteria en cultivo. En primer lugar, se realiza la baciloscopia sobre muestra clínica

se trata de una prueba sencilla basada en la tinción ácido-alcohol resistente que permite la detección del género *Mycobacterium*. El aislamiento de la bacteria a partir de cultivo en medios específicos supone el diagnóstico definitivo, pero implica largos períodos de tiempo, por lo que, aunque se considera fundamental, se han desarrollado métodos moleculares que permiten la identificación de la especie y el perfil de resistencias a partir de la muestra clínica lo que permiten adelantar enormemente el inicio de la administración del tratamiento más adecuado para el paciente.

3.1 Diagnóstico inmunológico

3.1.1. Prueba de la Tuberculina

La prueba de tuberculina es ampliamente utilizada por su bajo coste económico y su fácil realización. La prueba de la tuberculina ha sido hasta hace muy pocos años el único método diagnóstico para detectar la infección tuberculosa latente. Consiste en la administración intradérmica de un derivado proteico purificado (PPD) de *M. tuberculosis*. La lectura, se realiza tras 48-72 horas, en caso de exposición previa con el bacilo, se observará una induración (mayor o igual a 5 mm de diámetro) como consecuencia de la reacción inmunológica del paciente frente a la infección. Hay que tener en cuenta que, en casos de infección por bacterias no tuberculosas o pacientes vacunados con BCG, la prueba puede ser positiva, en este caso, se trataría de un falso positivo. De la misma manera, se pueden producir falsos negativos en casos de infección reciente (entre 8 y 10 semanas tras el contacto) o muy antigua, pacientes inmunodeprimidos o en caso de una incorrecta aplicación de la prueba [41], por tanto, en caso de sospecha es necesario la implementación de otra prueba confirmatoria.

3.1.2. Prueba de interferón gamma (IFN- γ)

Es una prueba de diagnóstico *in vitro* de la infección latente. Se basa en la detección del interferón gamma (IFN- γ) liberado por las células T en la sangre, una citocina fundamental en el control de la infección por *M. tuberculosis*, en respuesta a la estimulación con antígenos específicos de los bacilos de MTBC [40, 41]. Actualmente existen dos kits comerciales para realizar la prueba, la T-SPOT y el QuantiFERON. La T-SPOT requiere la separación de las células mononucleares de la sangre periférica, que, tras ser estimuladas con antígenos específicos, ESAT-6 (early secretory antigenic target 6) y CFP-10 (culture filtrate protein), son analizadas mediante la técnica de ELISPOT. Mientras que la prueba de QuantiFERON se realiza mediante la incubación de la sangre total con los antígenos específicos ESAT-6, CFP-10 y TB 7.7, la lectura y determinación de la cantidad de IFN- γ se realiza mediante ELISA. Aunque el costo es más elevado, la prueba IGRA es más específica que la prueba de la tuberculina produce menos reacciones cruzadas con la vacunación y permite una interpretación objetiva de los resultados [40-42].

3.2. Diagnóstico microbiológico

El objetivo del diagnóstico microbiológico es el aislamiento e identificación del organismo causante de la enfermedad y, en última instancia, conocer el perfil de resistencia a fármacos. Para ello es necesario disponer una muestra adecuada, en el caso de la TB pulmonar es necesario obtener dos a tres esputos del paciente en días consecutivos [43]. La obtención de una muestra de calidad depende de los pacientes: en los niños, la obtención de un esputo adecuado es difícil debido a su poca capacidad para expectorar y generar un esputo productivo, por lo que se suelen emplear el aspirado gástrico y los lavados bronquiales o broncoalveolares [43, 44]. En casos de TB extrapulmonar, se recogerán las muestras correspondientes al órgano afectado: orina, líquido cefalorraquídeo, sangre, medula ósea, biopsia ganglionar, etc.

3.2.1. Análisis microscópico (baciloscopia)

Mediante la baciloscopia se busca visualizar la presencia del bacilo en la muestra del paciente. Las micobacterias son difíciles de teñir con los colorantes básicos habituales debido al alto contenido de lípidos y ácidos grasos en su pared celular, especialmente los ácidos micólicos, sin embargo, gracias a su acido-alcohol resistencia (AAR), se pueden visualizar utilizando otros procedimientos. Los métodos clásicos de tinción son el Ziehl-Neelsen, que utilizan la solución de fucsina fenicada como colorante primario, que tiñe a la micobacteria de color rojo sobre un fondo azul o verde, dependiendo del contra-colorante utilizado [45].

Otro método ampliamente usado es la tinción fluorescente basada en Auramina-Rodamina. Al observar la preparación con luz ultravioleta, el microorganismo aparece fluorescente de color amarillo o naranja dependiendo del filtro empleado [46]. La finalidad de la baciloscopia es cuantificar la cantidad de bacilos presentes en la muestra, el resultado de la lectura se refleja mediante el número de bacilos por campo y el método de tinción empleado [29].

3.2.2. Cultivo bacteriológico

El cultivo es un método estándar de confirmación de diagnóstico de la enfermedad. Es un método sencillo que permite el aislamiento de la bacteria, realizar estudios de sensibilidad antibiótica y de caracterización molecular del microorganismo. Entre los métodos de cultivo clásicos están los medios sólidos como el 7H10, 7H11 de Middlebrook, Lowenstein-Jensen con base de huevo y medios líquidos enriquecidos como el 7H9 de Middlebrook. Además de estos métodos, existen otros métodos automatizados que permiten la detección automática de crecimiento bacteriano. Entre estos, el más extendido es el sistema BACTEC-MGIT 960 que mide consumo de oxígeno mediante fluorescencia, o el método BACT/ALERT 3D que mide la producción de dióxido de carbono mediante colorimetría, estos métodos mejoran el tiempo de respuesta obteniendo los

resultados en poco menos de dos semanas [47]. Una vez que el sistema informa de un crecimiento positivo es posible abordar el estudio de sensibilidad antibiótica mediante cultivo estándar o automatizado.

3.2.2.1. Métodos de sensibilidad antibiótica

a) Método de las proporciones: Este es un método fenotípico en el que se mide el crecimiento micobacteriano en medio sólido con concentraciones estandarizadas de los fármacos de primera y segunda línea [48, 49]. El procedimiento se realiza inoculando cantidades iguales de varias diluciones de un inóculo estandarizado en un medio a base de agar con y sin el fármaco de prueba. Se realiza en conteo de las colonias sin ninguno de los medicamentos (control). Las colonias del medio sin antibiótico indican el número total de bacilos sembrados y las colonias sobre el medio con antibiótico indican los bacilos resistentes. La relación de los segundos con los primeros indica la proporción de bacilos resistentes que existe en esa población estudiada. Por debajo de una determinada proporción, denominada crítica, la cepa se considera sensible, y por encima, resistente. Una cepa será resistente cuando exista crecimiento, en presencia del fármaco, equivalente al menos a un 1% del observado en el control [50]. Su mayor inconveniente es la demora en la obtención del resultado, porque depende del crecimiento en cultivo de MTB.

b) Métodos automatizados: La prueba de sensibilidad basada en cultivo líquido se lleva a cabo por métodos automatizados (BACTEC-MGIT, 960/BACTEC 460 TB system o Culture System II) [51-53], que acortan el tiempo de obtención de resultados, ya que permiten realizar simultáneamente el cultivo de MTB, y el estudio de resistencias frente a los dos fármacos más utilizados en el tratamiento de la TB (rifampicina e isoniazida). La tecnología BACTEC-MGIT 960 permite el monitoreo continuo de la fluorescencia positiva por el crecimiento bacteriano.

3.3. Diagnóstico molecular.

Los métodos moleculares tienen la ventaja de que, en la mayoría de ellos, la identificación de *M. tuberculosis* no requiere cultivo y, por tanto, se agiliza mucho el diagnóstico. Se trata de métodos de alta sensibilidad que permiten la identificación en muestras de baja carga superando la detección basada en baciloscopia. Los métodos moleculares comerciales principalmente están basados en sondas de hibridación o en PCRs (reacción en cadena de la polimerasa) específicas para caracterizar especies o perfiles de resistencia de las micobacterias.

3.3.1 Métodos de hibridación

Los métodos de hibridación se basan en la inmovilización de sondas específicas de ADN del MTBC sobre un soporte de membrana de nitrocelulosa y la realización de la hibridación con la muestra problema, por último, se lleva a cabo un revelado enzimático. Existen varios métodos comerciales que permiten identificar MTBC (INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 y GenoType CM) [54-56] y medir resistencias a fármacos de primera y segunda línea (INNO-LiPA y GenoType MTBDRplus/ MTBDRsl) [57, 58].

Para la caracterización de micobacterias a nivel de especie, se encuentra el sistema de GenoType MTBC que permite la identificación de MTB, así como de micobacterias no tuberculosas. Este método se fundamenta en la amplificación de una zona concreta del espacio intergénico de 16S-23S ADNr y la hibridación del producto amplificado sobre las diferentes sondas inmovilizadas en una tira de nitrocelulosa. El método se puede aplicar a partir de cultivos líquidos o sólidos. Al hibridar con múltiples zonas simultáneamente, estos métodos permiten la detección de posibles coinfecciones por diversas especies del MTBC en una misma muestra. Por tanto, es de gran utilidad epidemiológica e intervención terapéutica.

Para evaluar la resistencia a fármacos, dos métodos son los más utilizados, el kit de GenoType MTBDRplus, para la identificación de resistencia a isoniazida (H)

y rifampicina (R), revela mutaciones en los genes *katG*, *inhA* y *rpoB*, mientras que GenoType MTBDRsl detecta resistencia a un número mayor de fármacos: a fluoroquinolonas (FQ), etambutol (E), aminoglucósidos (kanamicina, KAN; amikacina, AMK; viomicina, VIO) y péptidos cíclicos (capreomicina, CAP) al identificar mutaciones en tres loci diferentes, *gyrA*, *embB* y *rrs* [57, 58].

3.3.2 Métodos basados en PCR

Los métodos basados en PCR son rápidos, sencillos y, en general, de elevada sensibilidad. Se han desarrollado PCRs convencionales y en tiempo real en diferentes formatos (simplex o multiplex) que se pueden aplicar sobre muestras clínicas directamente para la identificación de micobacterias y para la identificación de mutaciones de resistencia (*rpoB*, *inhA*) (Xpert MTB/RIF, Cepheid), lo que ha permitido agilizar el diagnóstico y el tratamiento de la TB. Las dianas genéticas más comunes se basan en la amplificación de regiones conservadas del ADN (región 16s-23s ribosomal, *hsp65*, *rpoB*, IS6110, etc.) para la caracterización genotípica del MTBC [59-62].

3.3.2.1. Ensayo GenXpert

El GeneXpert MTB/RIF (Cepheid) es una plataforma de PCR en tiempo real automatizada, integrada y semicuantitativa que permite un diagnóstico bacteriológico rápido de MTB y ofrece la posibilidad de conocer mutaciones de resistencia a rifampicina en menos de 2 horas. La rifampicina es un fármaco clave en el tratamiento de la tuberculosis, casi todas las cepas resistentes a este fármaco lo son también a isoniacida y, por lo tanto, la resistencia a rifampicina se considera un marcador de multirresistencia (resistencia a isoniacida y rifampicina). Cerca del 96% de las cepas de MTB resistentes a rifampicina presentan una mutación en una región de 81 pb del gen *rpoB* que codifica para la subunidad beta de la ARN

polimerasa (región *hot spot*), que es la región diana sobre la que se centra el análisis del Xpert MTB/RIF [63].

La plataforma Xpert consiste en un sistema cerrado que utiliza cartuchos desechables de un sólo uso que son independientes para el procesamiento de la prueba, lo que reduce al mínimo el riesgo de contaminación cruzada entre las muestras permitiendo realizar análisis con bajos requerimientos de bioseguridad e infraestructura. El cartucho de Xpert MTB/RIF está segmentado en cámaras, en cuyo interior contiene todos los reactivos para realizar la PCR: la liberación del ADN, la combinación con las soluciones/reactivos, la amplificación y la detección a través de fluorescencia liberada por sondas específicas. La determinación semicuantitativa, se realiza mediante sistema óptico de luminiscencia y el software interpreta y revela los resultados. Las muestras recomendadas son: expectoración espontánea e inducida, contenidos gástricos y lavados broncoalveolares [63, 64]. En su conjunto, Xpert MTB / RIF es un método de diagnóstico rápido y preciso para la TB que ayuda significativamente a los médicos a tomar sus decisiones clínicas [65].

4. Tratamiento

El objetivo principal de la terapia antituberculosa es eliminar los bacilos que causan la TB lo más rápido posible para evitar la aparición de resistencias, impedir recaídas por la presencia de bacilos persistentes y minimizar la generación de casos secundarios.

El diagnóstico de la TB sigue basándose esencialmente en la sospecha clínica, la prueba radiológica, la baciloscopia de la muestra y el aislamiento de la micobacteria. Para suministrar el tratamiento adecuado al paciente resulta crucial conocer las características de sensibilidad y resistencia bacteriana. La TB multidrogorresistente (TB-MDR) hace referencia a aquella producida por cepas que presentan resistencia al menos a isoniacida y rifampicina, mientras que la TB de

resistencia extendida (TB-XDR) es la generada por cepas MDR que presentan resistencia, además, a fluoroquinolonas y al menos a uno de los tres medicamentos inyectables de segunda línea (amikacina, kanamicina o capreomicina) [10].

La terapia antituberculosa se clasifica en 2 tipos de medicamentos según su eficacia, toxicidad o tolerancia durante el tratamiento: fármacos de primera y segunda línea. En función del perfil de resistencia de la cepa del paciente se debe establecer un esquema de tratamiento en el que se planteará el uso secuencial de los fármacos antituberculosos para conseguir la curación del paciente [10, 66].

4.1. Fármacos de primera línea

Los fármacos de primera línea son aquellos que se utilizan en primera instancia en la práctica totalidad de los enfermos que padecen TB con sensibilidad a los fármacos. Como conjunto son los más eficaces, mejor tolerados y más baratos. Estos fármacos son la isoniazida (H), rifampicina (R), pirazinamida (Z), etambutol (E) y estreptomycin (S). Se absorben bien por vía oral y, aproximadamente en 2 a 4 horas, alcanzan niveles máximos en suero, eliminándose casi por completo en 24 horas. Disminuyen rápidamente el número de microorganismos viables en el paciente, evitando así el contagio [10, 66].

4.2. Fármacos de segunda línea

Los fármacos de segunda línea presentan más efectos secundarios y son menos eficaces, por lo que su uso suele limitarse a enfermos con cepas resistentes a los fármacos de primera línea (TB-MDR/XDR). Estos fármacos se deben añadir a los de primera línea que todavía sean útiles en el tratamiento. En los casos de TB-XDR la intervención terapéutica requiere esquemas de tratamiento más complejos y realizar la combinación más adecuada de fármacos, para disminuir o eliminar la carga bacilar del paciente.

Entre el grupo de fármacos de segunda línea más comunes están las fluoroquinolonas (moxifloxacino, levofloxacino, ofloxacino, ciprofloxacino) conocidos como fármacos “esenciales” con actividad bactericida, esterilizante y con cierto grado de toxicidad [66, 67]. Entre los fármacos inyectables están los aminoglucósidos (amikacina, kanamicina), polipéptidos (capreomicina), estreptomina, cicloserina y otros fármacos de menor eficacia clínica y más tóxicos que limitan su uso, como la carbapenems (meropenem/imipenem), amoxicilina/clavulánico, ácido para-aminosalicílico (PAS).

La decisión de iniciar un determinado tratamiento de TB debe basarse en el conjunto de datos epidemiológicos, clínicos y microbiológicos. El esquema de tratamiento recomendado convencionalmente por la OMS tiene una duración media de 6 meses: durante los 2 primeros meses incluye el tratamiento con R, H, Z y E, seguido de 4 meses con R e H. Cuando se aísla la cepa y se demuestra que es sensible a todos los fármacos se retira el etambutol. Excepcionalmente, en casos paucibacilares (una infección con bajo nivel de bacilos en la expectoración) podría utilizarse un tratamiento con tres fármacos (RHZ) en la fase inicial indicada [10, 29]. Es complicado tratar y curar la tuberculosis resistente a los medicamentos, su manejo inadecuado puede tener resultados potencialmente mortales [10, 66].

4.3. Nuevos fármacos antituberculosos

El control de la tuberculosis se ve amenazado por la continua propagación de las cepas resistentes a medicamentos, debido a que su tratamiento i) requiere múltiples medicamentos, no siempre disponibles; ii) supone largos períodos de tiempo, difíciles de cumplir e iii) implica un alto costo, no siempre asumible. Esta problemática genera la necesidad de buscar nuevos fármacos que sean más eficaces, que permitan acortar la duración del tratamiento, que presenten menor toxicidad y mejor tolerancia para el tratamiento de los pacientes.

Desafortunadamente, no existen fármacos que puedan satisfacer todos estos requerimientos a la vez, por lo que la investigación farmacológica se enfoca en algunos de ellos, buscando nuevos mecanismos de acción que puedan ser alternativas o complemento a los medicamentos actuales para tratar la TB [68].

Entre los fármacos candidatos se encuentran el linezolid y la bedaquilina que han sido aprobados recientemente por la FDA (Food and Drug Administration), otros se encuentran en fase de prueba, como el delamanid y el pretomanid, con muy buena actividad tanto *in vitro* como en ensayos en pacientes y otros están en fase de desarrollo como la pyrifazimine, telacebec y delpazolid [68].

Estudios clínicos en pacientes han corroborado la actividad y eficacia de los nuevos fármacos. El linezolid posee buena actividad bactericida, pero presenta algunos efectos tóxicos (mielotoxicidad) en tratamientos prolongados (más de 2 semanas). Esto obliga a monitorizar frecuentemente al paciente porque la aparición de los efectos tóxicos conlleva a la suspensión del fármaco [67]. El delamanid, por su parte, posee una acción bactericida y esterilizante similar a la rifampicina lo que reduce la mortalidad de los pacientes, aunque presenta algunos efectos secundarios sobre el sistema cardiovascular [67]. Recientemente se demostró que la combinación de la bedaquilina, la pretomanida y el linezolid es muy eficaz a los 6 meses al finalizar en el tratamiento de pacientes con TB-MDR/XDR, aunque con ciertos efectos tóxicos asociados que hay que tener en cuenta [69].

Aunque estos fármacos son prometedores para tratar la TB, es necesario intensificar la investigación fundamentalmente para zonas con alta carga y de mucha prevalencia de TB. La instauración del tratamiento requiere de esquemas de combinación de fármacos muy variables, en pacientes con patrones de resistencia heterogéneos que dificultan la estandarización de la terapia [67, 70].

5. Epidemiología de la tuberculosis

La transmisión de la TB se produce por la dispersión aérea de bacilos como consecuencia de los aerosoles infecciosos generados por un paciente enfermo al hablar, toser o estornudar. El tiempo de contacto y los entornos compartidos con una persona enferma, determinan el grado de infectividad y transmisibilidad en los casos de TB [31, 71].

Los análisis epidemiológicos iniciales de la TB se basaban principalmente en el estudio de contactos entre pacientes mediante entrevistas para determinar la fuente de infección y evitar la aparición de casos secundarios. El estudio de contactos se enfoca en analizar los entornos más próximos que han estado en contacto con el paciente (familiar, laboral, etc.) durante un período de tiempo determinado. Se ha descrito que los contactos cercanos al paciente con TB-activa tienen un alto riesgo de adquirir TB, un solo paciente con TB pulmonar puede llegar a infectar a 10-15 personas de su entorno [72]. Por tanto, las investigaciones de contactos deben ser rápidas y precisas para detectar la TB latente antes que sea activa [73].

El estudio de contactos tiene la limitación de que fuera de los círculos cercanos más obvios, es difícil trazar la ruta de transmisión, que puede afectar a entornos de contacto más puntual o esporádico. Además, no permite conocer con certeza, en caso de contactos estrechos, si se trata o no de la misma cepa. A principios de los 90 se empezaron a aplicar métodos de caracterización fenotípica y genotípica, que incrementaron enormemente el conocimiento sobre la epidemiología de la TB [48, 53, 74, 75]. El refinamiento en el estudio de patrones genotípicos del ADN de los aislados de MTB fue el punto de partida para la identificación y caracterización de cadenas de transmisión y el nacimiento de la epidemiología molecular de la TB. La determinación de que pacientes infectados por una fuente común presentan genotipos idénticos o muy similares permitió definir lo que se conoce como “clúster” de transmisión, es decir, un grupo de casos

relacionados entre sí y que son resultado de la infección por la misma cepa. Aquellos casos no vinculados epidemiológicamente presentan genotipos muy diferentes y variables y son denominados casos “huérfanos”. La reciente aparición de las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS), ha permitido mejorar la precisión y el poder discriminativo de las técnicas de epidemiología molecular más convencionales. A continuación, se detallan los principales métodos de epidemiología clásicos, moleculares y genómicos implementados en el estudio de la TB.

5.1. Epidemiología clásica. Estudio convencional de contactos.

El estudio convencional de contactos (ECC) consiste en realizar el diagnóstico de TB, normalmente mediante ensayos inmunológicos, a todas aquellas personas que hayan tenido contacto estrecho con un paciente enfermo de TB [76]. El ECC se basa en un análisis por círculos concéntricos, considerando como círculo menor, el área de mayor exposición a la fuente de infección y se van ampliando paulatinamente los círculos de investigación a poblaciones cada vez de menor riesgo en función del tipo de espacio compartido y del tiempo de exposición al paciente. Normalmente, el estudio de contactos de un caso índice (el primero que conocemos) implica tres objetivos: i) diagnosticar a las personas enfermas o infectadas; ii) tratar precozmente a los enfermos e infectados y iii) reconstruir la cadena de transmisión para identificar el caso inicial de TB. Se ha descrito que encontrar pacientes portadores de TB entre los contactos depende de la carga que presente cada país, así, en países con baja incidencia es entre el 1% y el 4% de los contactos, mientras que países de alta carga se encuentra en torno al 10%-20% [76, 77]. Mediante el ECC se consigue detectar y tratar nuevos casos infectados, a los que normalmente se da tratamiento profiláctico con el fin de que la persona no desarrolle la TB. De este modo se evita la aparición de nuevos casos derivados de

estos últimos y se rompe, así, la cadena transmisión epidemiológica, impidiendo dispersión de la enfermedad.

5.2. Epidemiología molecular

La aplicación de diferentes técnicas moleculares permite llevar a cabo el genotipado de MTB, otorgándole a cada cepa una identidad específica (genotipo) para llevar a cabo análisis de vinculación entre casos en determinados contextos como son el estudio de brotes, tanto en la población general como en grupos específicos (ej. prisiones), el análisis de recurrencias (reactivaciones y reinfecciones) y la identificación de infecciones mixtas. El conocer el genotipo de las cepas circulantes permite identificar las cadenas de transmisión de una población, y definir la distribución geográfica de los linajes del MTBC [78-83]. La epidemiología molecular ha mejorado enormemente nuestro conocimiento sobre la dinámica de transmisión de la TB, incluso a nivel transnacional como consecuencia del aumento de los movimientos migratorios globales [84-86].

5.2.1. Técnicas de tipado molecular

5.2.1.1 Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción: RFLP-IS6110

La técnica de referencia RFLP-IS6110 para la tipificación de *M. tuberculosis* [87] consiste en el análisis de fragmentos de restricción obtenidos mediante digestión enzimática. La región IS6110 se encuentra distribuida a lo largo del genoma de los distintos miembros del complejo *M. tuberculosis* (en *M. bovis* normalmente contiene solo una copia). El número de copias (0-25 copias) y su ubicación en el genoma, son específicos de cada cepa y, por tanto, la combinación de ambos aspectos puede utilizarse como marcador para el genotipado de cepas. El análisis se realiza mediante la digestión enzimática (PvuII) del ADN genómico y los fragmentos generados se separan mediante electroforesis en gel. Posteriormente, tras la transferencia del ADN a una membrana, se procede a la

hibridación con una sonda (245 pb) marcada que es complementaria al extremo 3' de la secuencia IS6110. El revelado da lugar a un patrón de bandas, cada una de las cuales representa una única copia de la inserción IS6110, rodeada de secuencias de ADN flanqueantes de diferentes tamaños. El análisis de los patrones de RFLP, se realiza mediante programas informáticos que permiten determinar coincidencias y relación entre patrones genéticos [88].

Se trata de una técnica laboriosa que requiere una cantidad de ADN elevada, por lo que es necesario crecer la micobacteria en cultivo en grandes cantidades. Al tratarse MTB de un microorganismo de crecimiento lento, se requiere mucho tiempo para obtener la cantidad óptima de ADN y poder obtener el resultado. Además, se trata de una técnica con baja capacidad discriminativa y que carece de un sistema de normalización entre experimentos, todo ello ha conducido al desarrollo de otras técnicas de genotipado más sencillas y rápidas, basadas en PCR, que faciliten la comparación entre las cepas de MTB circulantes.

5.2.1.2. Espoligotipado

El espoligotipado (repeats-spacer oligonucleotide typing) es un método de genotipado de cepas de MTBC que consiste en el análisis de polimorfismos presentes en una región del genoma de repeticiones directas (región DR). La región DR consta de un número variable de secuencias repetitivas con un tamaño conservado de 36 pb que se encuentran separadas por secuencias no repetitivas de 34-41 pb llamadas espaciadores, 43 de estos espaciadores son utilizados para llevar a cabo el genotipado de las cepas del MTB [74]. Debido a que las DRs son secuencias altamente conservadas, la composición estructural de la región DR es característica de cada cepa. El patrón de espoligotipo de las diferentes cepas, conformado por un número determinado de DRs y la presencia o ausencia de los 43 espaciadores, se utiliza para realizar la comparación y establecer si existe o no relación epidemiológica entre las mismas.

La obtención de los espoligotipos consiste en la amplificación mediante PCR de los espaciadores usando oligonucleótidos específicos de los extremos de las secuencias DR. Uno de los oligonucleótidos está marcado con biotina para la detección de los productos amplificados. El segundo paso consiste en hibridar los espaciadores amplificados a una membrana de nylon que presenta, unidos covalentemente, los oligonucleótidos de los 43 espaciadores. La presencia de un espaciador se visualiza como un punto negro en la película de revelado que se traduce a valores numéricos donde el genotipo resultante se da en un formato binario (1 = presencia de espaciador; 0 = ausencia de espaciador). Esto permite normalizar los experimentos y compartirlos entre diferentes laboratorios.

El espoligotipado ha permitido clasificar a los aislados de MTBC en taxones o subespecies en función de la ausencia o presencia de espaciadores específicos para cada genotipo [89]. Esta técnica permite hacer el análisis de forma simple, robusta y altamente reproducible, partiendo de poca cantidad de ADN de partida [90]. Sin embargo, presenta un poder discriminativo menor que el RFLP por lo que se considera más útil en estudios de carácter filogenético que para epidemiología molecular [91, 92].

5.2.1.3. MIRU-VNTR

A lo largo del genoma de MTB se encuentran secuencias repetitivas en tándem (10–100 pb) denominadas minisatélites, que presentan variabilidad alélica relacionada con el número de repeticiones [93-95]. La técnica MIRU-VNTR (Unidades Repetitivas Micobacterianas Intercaladas-Número Variable de Repeticiones en Tándem) consiste en analizar el número de repeticiones en tándem de un número determinado de localizaciones (loci) del genoma. En primer lugar, se realiza una amplificación por PCR usando cebadores específicos para las regiones flanqueantes de los loci, y se determina el tamaño de los productos de amplificación, bien sea por la electroforesis convencional o mediante sistemas automatizados

(electroforesis capilar). Puesto que la longitud de las unidades de repetición de cada locus es conocida, el tamaño del producto de amplificación obtenido en cada caso permite calcular el número de copias del locus analizado. El resultado final es un código numérico sencillo denominado MIRUtipo que indica el número de repeticiones en cada locus analizado en un orden previamente establecido, este genotipo es específico de cada cepa y la comparación entre códigos permite realizar el análisis epidemiológico de vinculación entre casos (Figura 4).

El primer diseño de esta técnica incluía un panel inicial de 12 loci que, con el tiempo, se incrementó primero a 15 y, finalmente, a 24 loci que aumentó significativamente el poder discriminativo de la técnica [96].

Los fragmentos amplificados pueden ser analizados mediante electroforesis convencional en gel, esto supone analizar 24 productos de amplificación para cada ADN, esta aproximación es bastante laboriosa, puede generar cierto sesgo y problemas de reproducibilidad en los resultados del MIRUtipo. El análisis mediante electroforesis capilar implica el mutiplexado de los 24 loci en 8 PCRs triplex y un análisis automatizado que evita el sesgo, asegura la reproducibilidad y simplifica mucho el manejo. La adaptación de las 24 PCRs a un formato de reacción triplex, consiste en que uno de los cebadores de cada loci está marcado en 3' con fluorescencia, FAM, VIC o NED, presentando 3 diferentes longitudes de onda y colores. Cada loci amplificado emite una señal en forma de pico que por su color permite identificar de qué locus se trata y la posición del pico en el electroferograma indica el tamaño del producto amplificado y permite inferir el número de repeticiones de cada locus concreto.

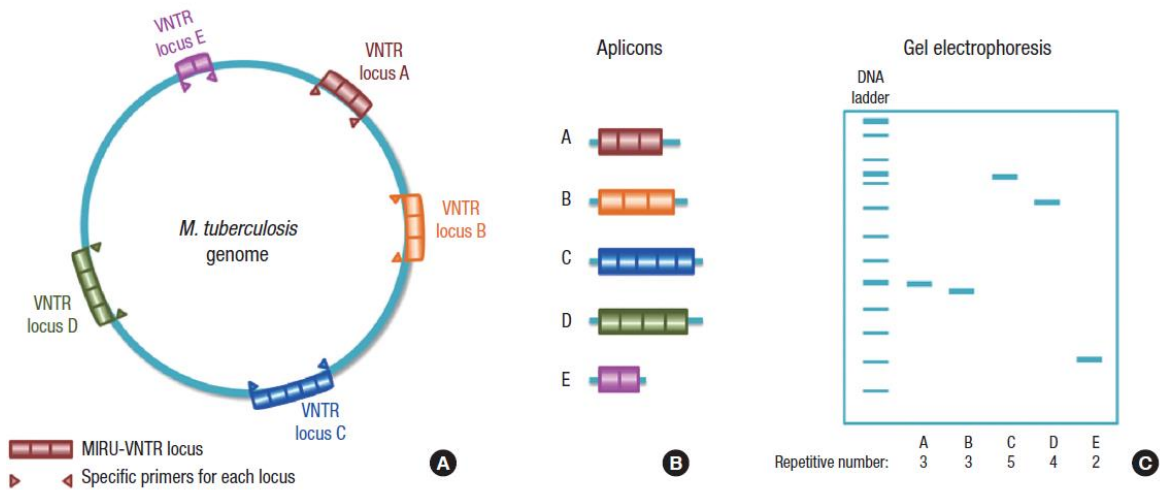


Figura 4. Genotipado por MIRU-VNTR. (A) Representación de 5 loci en el genoma de *M. tuberculosis* con diferente número de repeticiones. (B) Amplicones obtenidos tras la amplificación mediante cebadores específicos para cada locus. (C) Esquema de un gel de electroforesis en el que se representan los amplicones con diferentes tamaños que reflejan el número repeticiones de cada locus VNTR (Ei PW, *et al.*, 2016: *Methods for Molecular Strain Typing of M. tuberculosis*) [88].

El análisis por MIRU-VNTR, al estar basado en PCR, requiere poca cantidad de ADN, permitiendo incluso la aplicación directa sobre la muestra clínica, de esta manera se consigue disponer de la información epidemiológica en el mismo momento del diagnóstico, facilitando enormemente las tareas de búsqueda de contactos [97, 98]. Esta técnica es muy sencilla, presenta una mayor capacidad discriminativa que el RFLP, los MIRUtipos son fácilmente compartidos por diferentes grupos y actualmente sigue siendo la técnica de referencia de epidemiología molecular de la TB [96, 99-101].

5.3. Epidemiología genómica: Secuenciación de genoma completo (WGS)

Las técnicas de epidemiología molecular permiten analizar, en el mejor de los casos, entorno al 0.03% del genoma de MTB, por lo que la mayor parte de la información genómica no está siendo analizada y esto hace que presenten una capacidad resolutoria y discriminativa limitada [102]. El desarrollo de la epidemiología genómica basada en WGS ha permitido cubrir las limitaciones de los métodos de genotipado estándares. Desde el primer descifrado genómico de la cepa de referencia H37Rv de *M. tuberculosis* (4.4 Mb) en 1998 [103] hasta la fecha, la secuenciación genómica ha evolucionado considerablemente, simplificando el procedimiento, reduciendo costos y facilitando la interpretación de los resultados para su análisis. La epidemiología genómica es el método más preciso y de mayor resolución para responder diferentes interrogantes en el abordaje, control y vigilancia de la TB.

El primer estudio que demostró el poder de la secuenciación genómica como herramienta epidemiológica, fue realizado por Niemann *et al.*, [104] que, tras analizar mediante secuenciación de genoma completo tres cepas idénticas por las técnicas de RFLP y MIRU-VNTR, descubrieron que presentaban diferencias significativas en sus secuencias, cuestionando por primera vez la robustez de los clusters determinados por técnicas de epidemiología molecular. Un estudio de WGS llevado a cabo en el estado de Harlingen (Países Bajos), permitió determinar SNPs (single nucleotide polymorphisms) marcadores específicos de cepas y rompió un cluster definido por RFLP [105]. Poco después, Gardy *et al.*, [106] demostraron que los casos de un brote en British Columbia (Canadá), fueron causados, en realidad, por la presencia de dos cepas concurrentes en la zona separando los aislados en clusters distintos; de este modo, descifraron el origen y la dinámica de la transmisión de los casos de TB en esa población. Aunque estos hallazgos indujeron a la integración de la genómica como herramienta epidemiológica, el número de aislados analizados por los autores fue muy limitado. Debido a ello, se desarrollaron

nuevos estudios con enfoques a nivel comunitario y poblacional que permitieron mejorar criterios de análisis de la transmisión.

Para refinar la genómica como herramienta epidemiológica de la transmisión de la TB, Walker *et al.*, [107] realizaron un estudio poblacional analizando casos con diferente grado de relación epidemiológica entre ellos y definieron los umbrales que delimitan la vinculación entre cepas. Estableciendo que, dos casos están relacionados de forma directa o reciente cuando no se diferencian en más de 5 SNPs, mientras que aquellos casos que presentan más de 12 SNPs de distancia genética se consideran casos no vinculados epidemiológicamente.

El análisis de la WGS se basa en el estudio de los SNPs debido a que en MTB no sufren evolución convergente (homoplasia), fenómeno que sí es observado con otras técnicas moleculares como espoligotipado y MIRU-VNTR que presentan alta frecuencia de convergencia [108, 109]. Los SNPs se acumulan a una velocidad uniforme, por lo que pueden ser utilizados para medir la divergencia de cepas pudiendo actuar como relojes moleculares a la hora de comparar genomas bacterianos [110].

Los análisis de SNP son precisos, inequívocos y de alta confianza y permiten definir cadenas de transmisión reciente, así como, definir la direccionalidad de la transmisión. En este sentido, una cepa puede mantener los SNPs existentes y adquirir SNPs nuevos, pero es muy poco probable que ocurra una reversión, es decir, que un SNP adquirido recupere el alelo original. De este modo, se puede trazar la cronología y direccionalidad de la transmisión [111]. Se han realizado diferentes estudios poblacionales que emplean la epidemiología molecular para definir y caracterizar grandes clusters históricos [112-114]. La WGS permite abordar y clarificar eventos complejos como aquellos relacionados con los movimientos migratorios y que conllevan la transmisión transnacional de cepas de MTB [115-117]. Por todo ello, cada vez más se están dirigiendo esfuerzos a integrar la

genómica como herramienta diagnóstica y epidemiológica de forma rutinaria en los laboratorios clínicos [118, 119].

5.4. Herramientas epidemiológicas alternativas

La WGS alcanza niveles de precisión y poder discriminativo sin precedentes. La aplicación de esta tecnología durante el análisis de la transmisión y en casos de brotes emergentes ha demostrado ser revolucionaria [106, 107, 120]. Sin embargo, debido al coste asociado, al tiempo de ejecución que requiere y al análisis relativamente complejo que conlleva, la WGS no está al alcance de cualquier laboratorio. De forma generalizada, los análisis genómicos están dirigidos a estudios retrospectivos de investigación, resultando difícil dar el salto a la implementación en rutina para el rastreo sistemático de la transmisión de TB. Por su parte, los métodos moleculares como MIRU-VNTR, que están basados en PCR, proporcionan los resultados de forma rápida, son sencillos de ejecutar y fáciles de implementar, pero presentan menor poder de resolución y discriminación. Por ello, es necesario el desarrollo de nuevas alternativas que combinen la precisión de la WGS con la sencillez y rapidez de las técnicas basadas en PCR.

Una de estas estrategias es el empleo de PCRs diseñadas para la identificación de cepas específicas. Estas ASO-PCRs (allele-specific oligonucleotide-PCR) están basadas en la detección de SNPs específicos de las cepas que se quieren vigilar y que han sido identificados mediante WGS y filtrado con bases de datos universales de SNPs. De manera que, estos SNPs específicos son marcadores de la cepa y se han obtenido mediante WGS y, por tanto, son altamente discriminativos; su identificación mediante PCRs sencillas implica la detección inequívoca de la cepa vigilada.

La implementación de la ASO-PCR tiene como objetivo priorizar los recursos en la vigilancia de las cepas problemáticas que inducen los principales eventos de transmisión de TB. Esta estrategia requiere, en primer lugar, la identificación de

cepas de riesgo (resistentes, prevalentes, brotes emergentes, etc) cuya transmisión se quiere vigilar y que se caracterizan mediante MIRU-VNTR. Posteriormente, algunos representantes del cluster se someten a WGS para la identificación de los SNPs. El siguiente paso requiere el filtrado de los SNPs de la cepa con una base de datos que contiene los SNPs de más de 4700 genomas que representan toda la diversidad geográfica y filogenética del complejo MTB [121]. Los SNPs específicos resultantes del filtrado se utilizan como dianas selectivas para el diseño de ASO-PCR multiplex (Figura 5). Normalmente se incluyen entre 3-5 SNPs específicos por cepa en cada PCR. Una de las mayores ventajas que presenta esta estrategia es que se puede utilizar partiendo de muestra clínica directamente sin necesidad de crecer en cultivo. Esto permite acercar la identificación de la cepa al momento del diagnóstico conociendo desde el primer momento la vinculación epidemiológica con otras cepas y su composición genotípica.

La ASO-PCR, gracias a su simplicidad, es fácilmente transferible, pudiéndose aplicar directamente *in situ* en el entorno clínico donde las cepas se transmiten activamente. Es una herramienta muy versátil, de modo que, en una reacción de PCR multiplex en un solo tubo se pueden analizar simultáneamente varias cepas transmitidas activamente, además, permite la vigilancia prospectiva de las cepas tanto a nivel comunitario como poblacional [122-125].

Esta estrategia se ha aplicado en entornos de transmisión compleja de alta carga de TB para la vigilancia transnacional de cepas a efectos de la importación de nuevas cepas durante el movimiento migratorio, principalmente, en Almería [115]. La utilidad y versatilidad de este tipo de PCRs, ha sido demostrada mediante análisis de colecciones de forma retrospectiva para la actualizar la situación de cepas problemáticas que se transmiten eficientemente en una población [122, 126]. Así, como para abordar la alerta epidemiológica referente a casos de TB-MDR y TB-XDR, y cepas de alto riesgo como la cepa de linaje Beijing por su capacidad en la adquisición de resistencia, y transmisión persistente [123, 125, 127, 128].

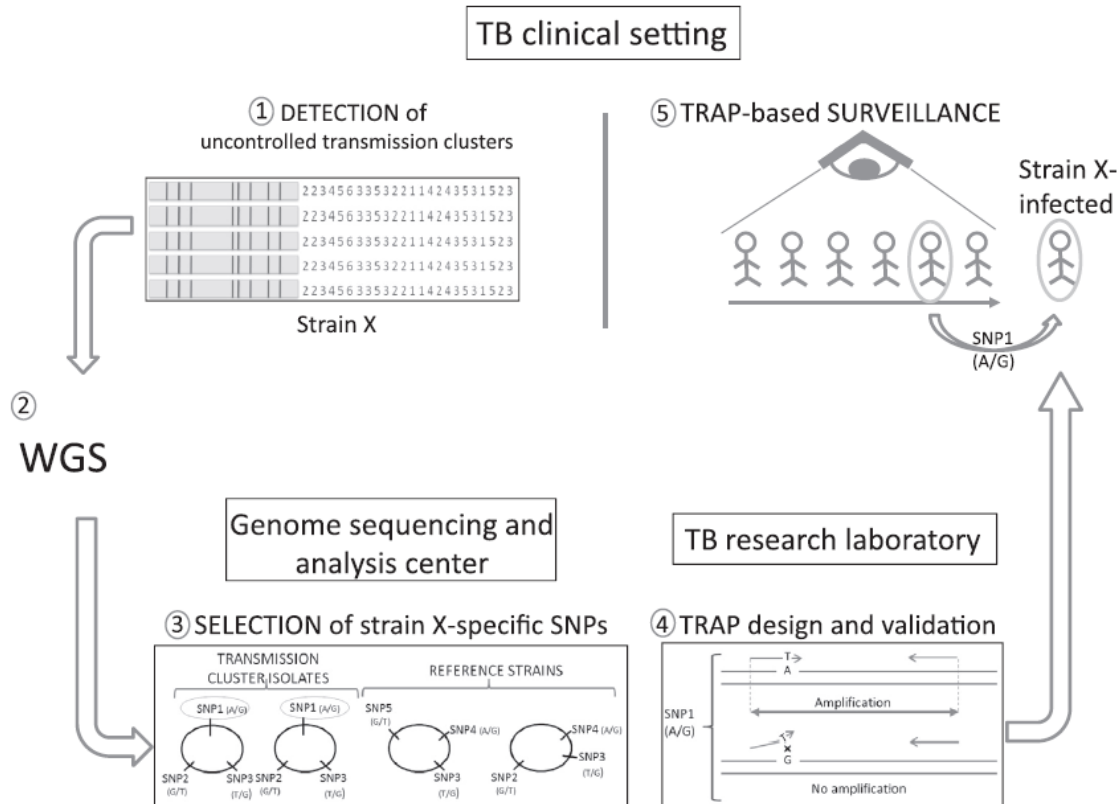


Figura 5. Gráfico que ilustra el flujo de trabajo entre el entorno clínico, el centro de análisis genómico y el laboratorio de investigación de TB. 1) La cepa X se identifica como perteneciente a un grupo de transmisión no controlada. 2) Se lleva a cabo la WGS de las cepas en el centro de secuenciación del genoma. 3) Los SNPs se detectan después de la comparación de la secuencia de la cepa X con la de las cepas de referencia. El SNP1 es compartido por las cepas que pertenecen al cluster y no está presente en la colección global de cepas. 4) El laboratorio de investigación de TB utiliza el SNP específico del grupo de transmisión para realizar el diseño y la validación de la PCR específica. La ASO-PCR específica permite identificar las cepas que pertenecen al cluster. 5) Una vez que se valida el ensayo, se transfiere fácilmente a un entorno clínico local para la detección y vigilancia continua (tanto de cultivo como de muestras directas) de la propagación de las cepas altamente transmisibles específicas y como apoyo al programa local de control de TB [129].

5.5. Aportaciones de la epidemiología molecular y genómica

La implementación de técnicas moleculares para el estudio epidemiológico de MTB ha permitido progresar en el conocimiento de la transmisión en entornos socio-epidemiológicos cada vez más complejos. La incorporación de la epidemiología genómica, debido a su precisión y poder discriminativo, ha permitido alcanzar el máximo nivel de resolución en la caracterización y definición de las cadenas de transmisión de MTB. A pesar de que actualmente, los programas de control de la TB utilizan de forma mayoritaria como herramientas principales de trabajo las técnicas moleculares, se está integrando, cada vez más, el lenguaje genómico en los estudios epidemiológicos optimizando la vigilancia y ayudando en la resolución de problemas que las técnicas convencionales no pueden solventar. La implementación de la epidemiología molecular y genómica ha permitido definir las tendencias epidemiológicas a nivel mundial, el estudio de las dinámicas de transmisión, trazar la importación de cepas debido a la migración, identificar contaminaciones cruzadas, analizar con precisión las recurrencias, así como, identificar brotes y vigilar la transmisión.

5.5.1. Vigilancia de cadenas de transmisión

El genotipado molecular permite estudiar los eventos de transmisión e identificar la propagación exitosa de cepas de MTB. Es necesario conocer los focos de transmisión y la emergencia de brotes para comunicarlo a las autoridades de salud pública y facilitar la intervención para frenar la expansión de la TB en la población. Los patrones de transmisión varían en los diferentes entornos, ya que dependen de varios factores, entre ellos: las estrategias de control de la TB existente, la presencia de cepas endémicas, la densidad de población, los patrones de migración, la geografía y la transmisibilidad de MTB a nivel local [130].

A lo largo de los años, se han desarrollado muchos estudios dirigidos a entender y vigilar la transmisión de cepas a nivel local y poblacional, poniendo

especial interés en las cepas de mayor riesgo y en los factores asociados a mayor transmisibilidad. En un estudio realizado a nivel nacional en Inglaterra se analizaron 1.808 aislados mediante RFLP y se observó que el 12% de los casos estaban agrupados en cadenas de transmisión. Los factores asociados a los casos en cluster fueron: el tratamiento antituberculoso previo, la TB pulmonar, la falta de vivienda y los fenómenos de migración poblacional [131]. Otro análisis de naturaleza similar, pero mediante el uso de la técnica MIRU-VNTR, se han descrito en diferentes países mostrando cifras de transmisión más elevadas, como un estudio nacional realizado en Portugal donde se analizaron los aislados de MTB recogidos durante 4 años y se detectó que el 63% de los casos formaban parte de cadenas de transmisión, con una evolución local de cepas asociada a individuos nacidos en Portugal y siendo principal factor de riesgo el abuso de alcohol [132]. Estos trabajos muestran que la transmisión de la TB en entornos de baja incidencia ocurre principalmente entre personas que viven en condiciones socioeconómicas desfavorables y, en algunos casos, en el entorno de la población migrante.

En general, la mayor parte de los casos de TB entre inmigrantes en países de baja incidencia se debe a la reactivación de la infección adquirida antes de la migración [131]. En una revisión reciente, que incluyó 15 estudios, sobre la transmisión de TB entre inmigrantes y poblaciones nativas en los países de la Unión Europea, mostró que la proporción de los aislados de TB en cluster oscilaba entre el 8,5% y 49,1% del número total de casos de TB analizados por técnicas moleculares y que un tercio de ellos involucraban clusters mixtos (inmigrantes/nativos). La principal conclusión del estudio fue que, en los países de la Unión Europea, la TB en poblaciones nacidas en el extranjero no tiene un impacto significativo sobre la TB en la población autóctona [133].

Muchos estudios describen que las cepas sensibles a fármacos tienen más posibilidades de formar parte de cadenas de transmisión que las cepas resistentes a fármacos, porque éstas tienen menor capacidad para transmitirse como

consecuencia de la pérdida de “fitness” y de aptitud infectiva derivada de la adquisición de mutaciones de resistencia [134-137]. La presencia en determinadas cepas de mutaciones, denominadas mutaciones compensatorias, permite recuperar el “fitness” de las bacterias resistentes dotándolas de capacidad para transmitirse y, por tanto, de generar cadenas de transmisión [138, 139]. De manera que, se han identificado grandes brotes de transmisión de cepas de alto riesgo de TB-MDR/XDR, mediante la aplicación de técnicas moleculares [140, 141]. Hay estudios que describen clusters de cepas TB-MDR de alta prevalencia en Argentina y Portugal [112, 142, 143], así como, la propagación internacional de un clon TB-MDR del linaje Beijing, particularmente en Asia oriental y central, Europa oriental y Sudáfrica [144, 145]. Las altas tasas de agrupación observadas entre los aislados de la familia Beijing no necesariamente indican una transmisión reciente. Para algunos de los complejos clonales dentro de esta familia, el genotipado por RFLP y MIRU-VNTR presenta un bajo poder discriminativo y sobrestima el alcance de la transmisión reciente, de manera que, algunos aspectos de la dinámica de transmisión de la TB podrían perderse o malinterpretarse [104, 113]. Aunque en algunos casos el problema puede resolverse agregando un conjunto definido de loci VNTR auxiliares específicamente para la familia Beijing [146], es preferible utilizar la WGS para obtener mayor precisión en los resultados, para caracterizar cepas endémicas e identificar el origen de los brotes [104, 112, 114, 120, 147].

La vigilancia de cadenas de transmisión puede ser compleja en áreas donde hay grandes poblaciones de migrantes. En España, se describió un cluster de transmisión de grandes dimensiones analizado por MIRU-VNTR que involucraba a 17 pacientes procedentes de Marruecos y España. La aplicación de la WGS sobre estos aislados permitió desvelar que solo 6 de ellos formaban, en realidad, parte de una cadena de transmisión activa, el resto de los casos eran importaciones independientes de la misma cepa procedente de Marruecos, que en ocasiones habían generado cadenas de transmisión limitadas (2-3 pacientes). De manera que,

11 casos fueron mal clasificados debido a que se trata de una cepa prevalente en Marruecos que no presenta variabilidad en los marcadores analizados por la técnica de MIRU-VNTR y solo la alta resolución de la genómica es capaz de desvelar las diferencias entre las cepas. Este hallazgo es de gran relevancia, puesto que la intervención epidemiológica no es la misma si se trata de un brote de grandes dimensiones que afecta a 17 pacientes, que si la mayoría de los casos son importaciones independientes que no suponen una alerta epidemiológica [115].

En resumen, la capacidad discriminativa de los diferentes métodos de genotipado impacta en la definición de los clusters de transmisión y el vínculo epidemiológico entre los casos. En algunos casos, patrones idénticos de RFLP o MIRU no reflejan un vínculo de transmisión reciente o directa entre los casos y esto puede ser debido a fenómenos de evolución convergente, o tratarse de complejos clonales o de cepas prevalentes que circulan durante años en una población particular. Por esto, cada vez más se están dirigiendo esfuerzos a utilizar la genómica o herramientas alternativas basadas en la genómica como herramientas epidemiológicas de primera elección [104, 120, 148, 149].

5.5.2. Estudio de eventos de contaminación cruzada

El genotipado de las cepas de MTB mediante técnicas moleculares o genómicas es fundamental para la identificación de contaminaciones cruzadas entre muestras del laboratorio. La primera estimación de la frecuencia de estos eventos se realizó en 1994 en un laboratorio de referencia en Dinamarca. Se hizo un estudio en el que se analizaron 123 cultivos positivos de TB en los que se sospechaba contaminación cruzada, se utilizó el RFLP como técnica de genotipado y el resultado mostró que 49 de ellos (3.4% del total de cultivos positivos) eran contaminaciones de laboratorio [150]. Desde entonces han sido numerosos los estudios en los que se ha analizado la contaminación cruzada mediante el uso de diferentes técnicas de genotipado [151-154].

La identificación de eventos de contaminación cruzada es más difícil en entornos donde la TB es altamente endémica, puesto que, los genotipos idénticos son más probables como resultado de las altas tasas de transmisión o por la presencia de cepas prevalentes en la población [113]. En estas circunstancias sería útil la utilización de la WGS para distinguir cepas idénticas con mayor precisión en aquellos casos de alta sospecha de contaminación cruzada y que presentan genotipos moleculares iguales.

Las implicaciones que conlleva la no detección de la contaminación cruzada son muy importantes, Northrup *et al.*, [155] estimaron, a través de un estudio realizado en Massachusetts (EE. UU), que el costo de los falsos diagnósticos de TB ascendía aproximadamente a 10,873 dólares por paciente. Además, los falsos positivos acarrearán tratamientos farmacológicos e ingresos hospitalarios injustificados [156, 157]. El realizar el genotipado en tiempo real, directamente sobre la muestra clínica [158], puede acortar el tiempo de detección de la contaminación cruzada y detener de forma rápida el tratamiento, los ingresos y las investigaciones de contacto, cuando corresponda.

5.5.3. Genotipado de cepas para el estudio de recurrencias

Las recurrencias ocurren, en función del entorno, en un porcentaje aproximado del 2-20%, en pacientes con TB infectados con cepas susceptibles y que reciben un tratamiento adecuado [159, 160]. Ante un caso de recurrencia, el único modo de diferenciar si se trata de una reactivación (producida por la cepa responsable del primer episodio) o de una reinfección (causada por una cepa distinta a la responsable del primer episodio) es el empleo de técnicas de genotipado, bien sean moleculares o genómicas. De modo que, la comparación de los genotipos o de las secuencias de la cepa de cada episodio permitirá resolver ante cuál de los 2 escenarios nos encontramos.

En función de la incidencia de la TB en el país, el porcentaje de recurrencias debidas a reinfecciones varía. Un estudio nacional realizado en Estonia detectó el 45% de reinfecciones entre los pacientes que presentaron segundos episodios con cepas TB-MDR analizado mediante el uso de genotipado por RFLP y espoligotipado [161]. En otros países con incidencia moderada se encontraron resultados similares (36%) en el porcentaje de re infectados [162]. En entornos de baja incidencia, las recurrencias son poco frecuentes y son más probablemente causadas por una reactivación de la cepa inicial que por una reinfección. Diferentes estudios realizados en España, Dinamarca y Nueva Gales del Sur mostraron unos porcentajes de reinfecciones en torno a 20-26% de los casos recurrentes por MIRU-VNTR y RFLP [79, 160, 163]; la cifra de recurrencias que puede variar hasta ~4% en algunos países como Inglaterra [164].

La aplicación de la WGS ofrece un mayor poder discriminativo a la hora de establecer la naturaleza de una recurrencia. En un estudio multicéntrico realizado en Reino Unido con casos recurrentes procedentes de Malasia, Tailandia y Sudáfrica se aplicaron de forma simultánea el genotipado por MIRU-VNTR y la WGS. El resultado mostró que de los 33 casos que por WGS presentaron poca distancia genética (0-6 SNPs) indicando que se trata de reactivaciones, 6 fueron clasificados como reinfecciones por MIRU-VNTR. Mientras que la WGS identificó 6 casos de infecciones mixtas, el genotipado por MIRU los catalogó como reinfecciones (4 casos) y reactivaciones (2 casos) [110]. Por tanto, la resolución que aporta la WGS es superior a la obtenida por técnicas de genotipado convencional y en ocasiones, esto es clave [113, 120, 122]. En un estudio realizado por Merker *et al.*, [165] en el que se estudió la evolución intrahospitalaria de aislados seriados de tres pacientes con TB-MDR que evolucionaron a TB-XDR. El análisis reveló la presencia de subpoblaciones clonales coexistentes a largo plazo que mostraban diferentes combinaciones de alelos resistentes a los medicamentos y gracias a la

Introducción

WGS, se detectó una reinfección exógena por una cepa TB-XDR no diferenciada por RFLP.

El control óptimo de la transmisión de la TB depende del empleo del mayor número de métodos y estrategias disponibles, incluyendo el ECC, las técnicas moleculares y la genómica. La combinación de todas ellas o de parte de las mismas permitirá obtener una fotografía clara de la distribución de cepas y de las dinámicas de transmisión en una población, facilitando la intervención y la reducción de la expansión.

Capítulo II. Transmisión de patógenos relevantes en el entorno nosocomial

1. Patógenos relevantes en el entorno nosocomial

1.1. Problema global

Se definen como infecciones nosocomiales, aquellas adquiridas durante la estancia en un hospital, dándose un margen de 48 horas tras el ingreso del paciente sin que hubiera constancia de ellas para considerarse como tales [166].

Las infecciones nosocomiales constituyen un grave problema de salud de dimensión global. Son numerosos los estudios focalizados en este tipo de infecciones tanto en pacientes adultos como en niños o neonatos, realizados en países desarrollados como en países en desarrollo con recursos limitados [167, 168]. Se estima que la prevalencia en países de bajos/medios recursos varían entre 5.7%-19.1% [169]. En países desarrollados las cifras pueden ser menores, aunque el rango de prevalencia de la infección nosocomial es amplio (3.5% a 12%). El Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC) estima una tasa de prevalencia promedio del 7.1% en los países europeos, mientras que en Estados Unidos la cifra se sitúa en torno al 4.5% (2002) [168]. En España, el 7-8% de los pacientes que reciben asistencia sanitaria sufren alguna infección nosocomial [170, 171].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) hace referencia a que las tasas de prevalencia de infección nosocomial son mayores en pacientes con mayor vulnerabilidad por causa de su edad avanzada (>65 años), enfermedad subyacente o quimioterapia, siendo más frecuentes en salas quirúrgicas y unidades de cuidados intensivos (UCI) [168]. Las cifras de distribución de infecciones nosocomiales por unidades y grupos de edad se pueden extraer de los grandes estudios de prevalencia, como el que recoge los datos de 47 hospitales de 14 países de diferentes continentes, con tasas globales para cada hospital participante entre el

3% y el 21%. Las cifras más altas fueron recogidas en UCI (13,3%), salas quirúrgicas (13,1%) y ortopedia (11,2%). Los niños menores de 1 año mostraron una prevalencia de infección del 13.5% mientras que la de los adultos mayores de 64 fue del 12.0%. En los niños, las infecciones más comunes correspondieron al tracto respiratorio inferior, piel y sistema digestivo. En los ancianos, predominaban las infecciones del tracto urinario [172].

Las infecciones nosocomiales están entre las principales causas de defunción y de aumento de morbilidad en pacientes hospitalizados. Es complejo precisar el coste asociado a estas infecciones. En el Reino Unido, Coella *et al.*, estimaron la participación del coste derivado de la prolongación de período de hospitalización con respecto al sobre coste adicional y representó el 95% en ortopedia, 94% en ginecología y 92% en cirugía general y urología. Este sobre coste reflejaría los gastos de personal (~70%), la administración de medicamentos (~10-15%) [173] y otros gastos asociados a la prevención y la vigilancia de las infecciones [174, 175]. La terapia antibiótica fue el segundo contribuyente al costo [173]. El gasto asociado a las infecciones nosocomiales se incrementa con la implicación de microorganismos MDR, que representan un coste económico por paciente en torno a 5.000 y los 25.000 euros [176].

Se estima que alrededor de 12-17 microorganismos causan en torno al 85% de las infecciones nosocomiales [177]. A la hora de determinar los patógenos más frecuentemente responsables de infecciones nosocomiales debemos de considerar a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* [172], también situados a la cabeza en un estudio multicéntrico (10.5% de infecciones nosocomiales) que abarcó 4,634 pacientes de 27 hospitales de la región mediterránea, en el que la mayoría de las infecciones fueron causadas por *Escherichia coli* (17.2%), *Staphylococcus aureus* (12.5%), *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* (9.2%). Las infecciones fueron asociadas significativamente con ventilación mecánica, hospitalización ≥ 8 días, sonda urinaria, diabetes y edad [178]. Otros estudios

revelan situaciones más singulares, como un estudio español que mostró que las infecciones nosocomiales más frecuentes estaban causadas por *Escherichia coli* (15.78%), *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (9.62%), correspondiendo a infecciones en heridas quirúrgicas, en el tracto urinario, en el tracto respiratorio e infecciones del torrente sanguíneo relacionadas con catéter [171].

Desde el punto de vista de la resistencia a antibióticos, el 16%-20% de los brotes nosocomiales incluyen fenotipos resistentes a múltiples fármacos (MDR) o de resistencia extendida (XDR), siendo las cifras de resistencia asociadas a brotes superiores en Gramnegativos (20%-40%) [177]. En un estudio realizado por Gastmeier *et al.*, [179] el 77% de los brotes causados por *S. aureus* fueron resistentes a la meticilina, mientras que entre los brotes que implican patógenos MDR, 49.3% correspondieron a *K. pneumoniae* y 37.5% a *Acinetobacter baumannii*.

La aparición de brotes asociados a resistencias puede constituir una emergencia global. Como ejemplo representativo de propagación a escala intercontinental podemos mencionar la epidemia mundial de infección producida por una cepa (genotipo 027/BI/NAP1) de *Clostridium difficile*, que alcanzó su punto máximo en 2007 (>40% de los casos en el Reino Unido). Se considera que la propagación de esta cepa fue facilitada por su resistencia a fluoroquinolonas y por sus niveles elevados de producción de enterotoxinas, lo que condujo a episodios de diarrea severa y a una mayor contaminación ambiental por un nivel superior de producción de esporas [180].

Hay una gran variedad de dinámicas y rutas de transmisión responsables de los diversos brotes nosocomiales. El origen más frecuente de estos brotes descansa en los propios pacientes (25,7%), seguido de la participación en la transmisión de equipos o dispositivos médicos (11,9%), del entorno ambiental (11,6%) o del personal médico que actúa como vector (10,9%) [179]. Los brotes pueden quedar autolimitados dentro del entorno hospitalario, sin embargo, pueden expandirse a la

comunidad, bien tras el alta de los pacientes, bien a través del personal sanitario y los visitantes. A todo ello se debe de añadir la posible participación de los alimentos y el agua, conformando todo ello una compleja red de vías de transmisión y de factores implicados. La transmisión nosocomial de persona a persona es una de las rutas más relevantes, ya sea de forma directa o indirecta (Figura 6). Un estudio de 2351 casos con infección por *Streptococcus pyogenes* entre 1992 y 2000, demostró que el 12% de los casos correspondieron a infecciones nosocomiales cuya ruta de

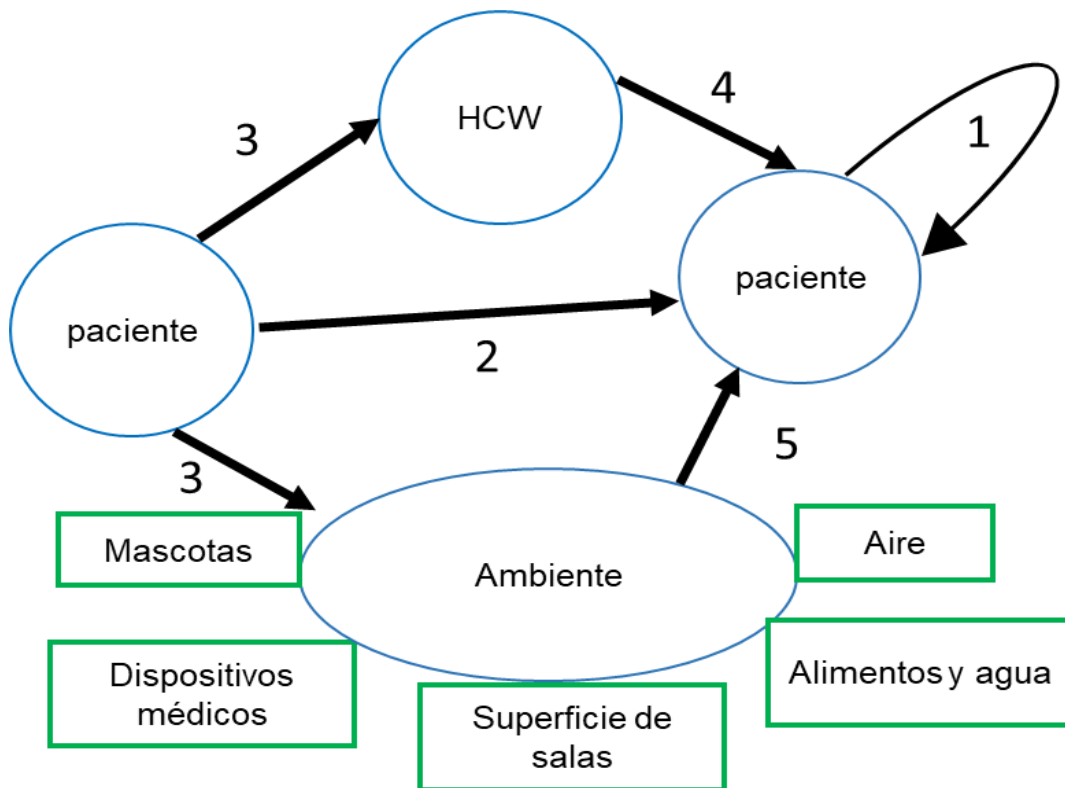


Figura 6. Rutas de adquisición de infecciones nosocomiales. 1) Infección por la propia microbiota del paciente índice. 2) Transmisión directa paciente-paciente. 3) Transmisión indirecta de paciente a paciente. 4) Transmisión con participación de personal sanitario (HCW). 5) Transmisión desde el entorno ambiental. (Figura adaptada de Jenkins, 2017: Nosocomial infections and infection control [181]).

propagación fue la transmisión de paciente a paciente. La investigación epidemiológica, apoyada en estudios de caracterización genotípica de las cepas por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) permitió identificar el papel de vectores intermediarios, tales como un auxiliar implicado en el transporte de pacientes o diversos trabajadores sanitarios, en los que se pudo comprobar la colonización con la cepa implicada en el brote. La caracterización precisa de los brotes permite la instauración de medidas de control adaptadas a la realidad; en este caso, se aislaron los pacientes ingresados en la UCI con fascitis necrotizante y se incrementó el énfasis en la identificación y tratamiento de profesionales sanitarios portadores [182]. De modo equivalente, se han descrito brotes nosocomiales por bacterias MDR con la participación mayoritaria de la transmisión persona-persona. En 2006 se comunicó un brote de estas características en una UCI en Taiwán, por *Acinetobacter baumannii* MDR. El estudio epidemiológico, microbiológico y molecular demostró la participación de una cepa epidémica aislada en pacientes y en muestras ambientales y condujo a la descripción de una probable ruta de transmisión con la participación del personal y los equipos médicos [183].

El otro gran bloque de factores causantes de brotes nosocomiales implica el uso de dispositivos médicos contaminados o de procedimientos que conducen a una posible contaminación (Figura 6). El uso de catéteres vasculares centrales, respiradores mecánicos o catéteres urinarios constituyen elementos habitualmente asociados a infecciones del torrente sanguíneo, neumonías e infecciones del tracto urinario, respectivamente. Esta asociación es especialmente habitual en los pacientes en UCI donde coincide el uso prolongado de estos dispositivos y durante períodos prolongados [184]. Cabe destacar la asociación de *A. baumannii* a infecciones nosocomiales MDR vinculadas a ventiladores contaminados [185].

1.2. Infección nosocomial por *Mycobacterium chimaera*.

1.2.1. Aspectos generales del microorganismo

Mycobacterium chimaera (*M. chimaera*) pertenece al complejo *Mycobacterium avium* (MAC) entre los que se encuentra *M. avium* y *M. intracellulare* [186]. Es una micobacteria no tuberculosa (NTM) de crecimiento lento, no móvil y que no forma esporas. Como organismo ambiental, *M. chimaera* se ha identificado en fuentes de agua, incluido el agua doméstica y posee la característica de formar biopelículas en los sistemas de agua [187], identificándose en los circuitos de agua hospitalaria [188]. *M. chimaera* está generalmente asociada a infecciones respiratorias, y diseminadas, principalmente en pacientes inmunocomprometidos [189, 190].

Su diagnóstico microbiológico, requiere del cultivo en medios específicos de micobacterias (Middlebrook 7H10, 7H11 y L-J) de las muestras clínicas, dependiendo de la afección, respiratorias, sangre, médula ósea, tejido o material protésico implantado u otro material considerado como caso sospechoso. La identificación se realiza por métodos moleculares. En la mayoría de los casos se llega a la asignación únicamente del complejo MAC. La posterior diferenciación de *M. chimaera* dentro de este complejo no es habitual y se basa en la secuenciación regiones y genes conservados como la región 16S ADNr, las ITS o el gen *hsp65* [191].

El tratamiento óptimo para *M. chimaera* no está definido, por lo que se siguen las pautas para el tratamiento de MAC. La terapia combinada se basa en macrólidos (claritromicina; azitromicina), rifamicina (rifampicina; rifabutina) y etambutol; en ocasiones, se suele complementar con amikacina intravenosa o quinolonas [191, 192].

1.2.2. Emergencia global por infecciones por *M. chimaera*

1. 2.2.1. Descripción del evento

Recientemente, *M. chimaera* ha sido foco de atención por su asociación con un evento global de infecciones en pacientes sometidos a cirugía cardíaca. Los primeros casos fueron reportados en Zúrich (2011) y correspondieron a 2 pacientes con infección diseminada y antecedente de cirugía valvular protésica [193]. Desde ese momento hasta la fecha, se han recogido derivación más de 140 casos en todo el mundo de pacientes que se sometieron a cirugía de corazón abierto [194-197].

El estudio epidemiológico de este evento global ha permitido determinar que la mayoría de los casos de infección, durante su cirugía cardíaca, habían sido expuestos a aerosoles generados por dispositivos calentadores-enfriadores (Heater-cooler unit: HCU) del modelo Stöckert 3T-HCU (LivaNova, Londres, Reino Unido), que se utilizan aproximadamente en el 70% de los quirófanos, para mantener la circulación extracorpórea durante la cirugía cardíaca (Figura 7) [198-200]. Con el fin de proporcionar un campo sin sangre para la cirugía cardiovascular, los dispositivos HCU reemplazan temporalmente la función cardiopulmonar, manteniendo del flujo sanguíneo y la oxigenación. Para ello, el HCU hace circular agua a través de intercambiadores de calor y sangre tibia o fría que pasa a través de los circuitos.

Diversos trabajos han demostrado la exposición de los pacientes durante la cirugía a aerosoles con *M. chimaera*, que proceden de los circuitos de agua del HCU, contaminados con esta micobacteria. La ruta probable de transmisión para estas infecciones es la contaminación directa de la cavidad torácica abierta con aerosoles que contienen *M. chimaera*, procedentes del agua contaminada y dispersados por los ventiladores de enfriamiento del HCU (Figura 7) [201, 202].

Se han determinado factores moduladores del riesgo de exposición que incluyen: 1) duración de la exposición a HCU, 2) año de fabricación del HCU, 3)

programa de desinfección del HCU, 4) distancia y el posicionamiento del HCU en la sala de operaciones, y 5) el sistema de ventilación en la sala de operaciones [191].

Aunque la mayoría de las infecciones se han asociado a una cirugía previa a corazón abierto, también se han reportado infecciones tras cirugía cardíaca mínimamente invasiva [203]. A pesar de que *M. chimaera* se ha aislado en tanques de agua de oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO) [204] la ausencia de aerosoles derivados del uso de estos dispositivos puede explicar la ausencia de infecciones asociadas. Aunque la alarma epidemiológica ha estado centrada en *M. chimaera*, otras NTMs ambientales (*M. kansasii*, *M. avium*, *M. abscessus* etc.) también se han descrito asociadas a la contaminación de 3T-HCU [195, 198].

La capacidad de *M. chimaera* para formar biopelículas, su adherencia a superficies en las interfaces aire-agua y la alta hidrofobicidad de su pared celular explican su resistencia frente a la descontaminación [205, 206], lo que obliga a la descontaminación exhaustiva de los dispositivos HCU, aunque incluso estas medida de control pueden ser insuficientes [205, 207, 208]. Esto conduce a la recomendación de descartar el uso de los HCU contaminados y reemplazarlos por unidades nuevas. Alternativamente, se ha propuesto aislar los HCUs en habitáculos independientes dentro de los quirófanos, o conducir las salidas de aire de ventilación al exterior, para minimizar la contaminación por aerosolización [191].

1.2.2.2. Caracterización detallada de los aislados del brote

Durante el desarrollo del brote, se han realizado esfuerzos para ofrecer apoyo molecular y genómico para la optimización de la identificación de *M. chimaera* y la caracterización de los aislados.

Desde el punto de vista diagnóstico, se han desarrollado PCR específicas para la detección precoz de la presencia del patógeno. En este sentido, Zozaya-Valdéz *et al.*, [209] desarrollaron una PCR en tiempo real específica para detectar *M. chimaera* en muestras clínicas y ambientales. El diseño de la PCR fue realizado

con la evaluación de 354 genomas micobacterianos con la confirmación de *M. chimaera* dentro del grupo filogenético. La comparación *in silico* de genomas procedentes de diferentes partes del mundo mostró la presencia de seis regiones conservadas de ADN presentes sólo en *M. chimaera*, una de estas regiones fue seleccionada para el desarrollo de la PCR cuantitativa. La técnica fue probada con diferentes especies bacterianas (40 micobacterias y 22 bacterias de 21 géneros diferentes) y presentó una especificidad del 100% y una eficiencia de amplificación del 94%. Cuando se analizó en muestras de agua de unidades del dispositivo enfriador-calentador HCU la PCR mostró una sensibilidad del 100% respecto al cultivo, con un límite de detección absoluto de alrededor de 10 CFU (equivalente a 100 CFU/ml de sangre completa), por lo que se trata de una técnica específica, rápida y precisa para detectar la presencia de *M. chimaera* en diferentes muestras.

Con el fin de permitir un análisis de alta resolución de las causas del brote se aplicó WGS para determinar las relaciones filogenéticas entre los numerosos aislados clínicos y ambientales [200, 203, 210, 211]. Zhang *et al.*, reportaron que las cepas clínicas acumulaban una escasa diversidad (7-10 SNP) y, además, los aislados de los HCUs diferían entre ellos únicamente en 4-6 SNP. La similitud asimismo, entre los representantes clínicos obtenidos en Europa, Australia / Nueva Zelanda y EE. UU y los ambientales [200, 210], condujo a asumir una misma fuente común de infección, sugiriendo la contaminación de las HCUs en el lugar central de producción [200, 202].

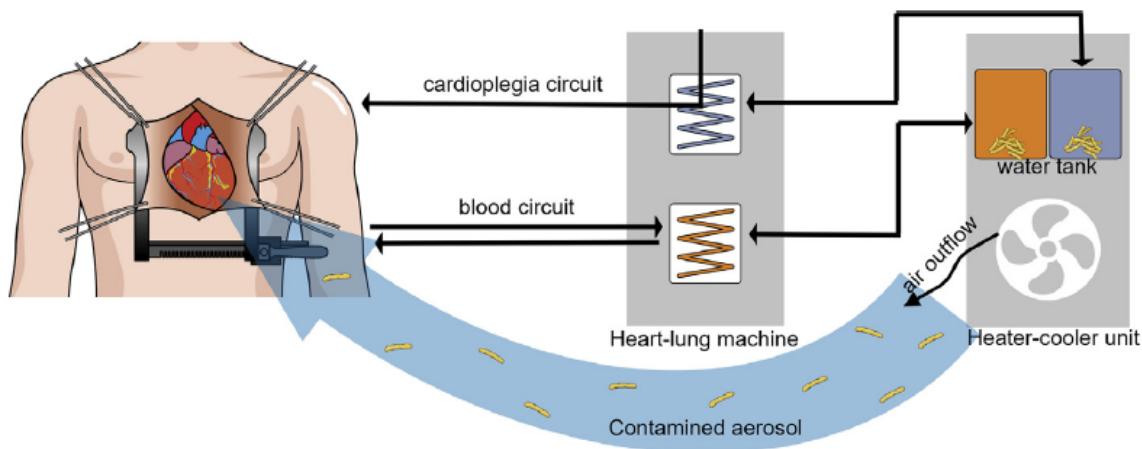


Figura 7. Descripción del flujo de componentes durante la cirugía cardíaca con derivación cardiopulmonar (Riccardi *et al.*, 2019: *Mycobacterium chimaera* infections: An update [201]).

1.2.2.3. Epidemiología de las infecciones por *M. chimaera* asociadas a HCUs

Es difícil asegurar el haber precisado la magnitud del problema derivado de las infecciones por *M. chimaera* asociadas a exposición a HCUs contaminados. Esto es debido a que los síntomas iniciales pueden ser inespecíficos, sutiles y aparecer meses o años (2 a 3 años) después de la cirugía [191, 201]. Por lo general, el desarrollo de los síntomas ocurre, en promedio, de 15 a 17 meses después de la cirugía, pero el período de incubación puede variar de 6 semanas a más de 5 años [192, 196]. Debido, en parte, al largo período de incubación, la sospecha clínica de infección diseminada por *M. chimaera* a menudo es baja en la presentación inicial.

A pesar de la alarma inevitable derivada de la descripción del evento global de infecciones por *M. chimaera* por exposición a HCUs contaminados, su riesgo es mucho menor al de otro tipo de infecciones nosocomiales [177], incluso inferior al de infecciones nosocomiales por NTMs de rápido crecimiento responsables de infecciones asociadas a cirugías de corazón abierto [212], así como al riesgo de

otras infecciones del sitio quirúrgico profundo, y por supuesto, inferior a neumonías nosocomiales, infecciones del tracto urinario o infecciones del dispositivo de acceso vascular [195, 213].

Una evaluación epidemiológica global (basada en 300,000 cirugías de reemplazo de válvulas) estima en 156–282 el número de casos/año con infección invasiva por *M. chimaera* invasiva, considerando los 10 países con mayor actividad en reemplazo de válvulas cardíacas [214]. Un estudio nacional en Suiza detectó 11 casos para un total de 19,146 procedimientos de reemplazo valvular durante un periodo de 10 años, con un leve incremento en la incidencia (0.16-0.25) desde el primer caso reportado (2011) y un promedio de prevalencia de 0.73 casos por 1000 procedimientos [214], cifras que varían levemente en otros países. En el Reino Unido la incidencia de casos estimada fue de 0.39 casos por cada 10,000 pacientes/año [215], mientras que, en los hospitales de EE. UU, las tasas de incidencia reportadas entre los pacientes expuestos a HCU oscilaron entre un rango de 1/100 a 1/1,000 personas [216].

La población en riesgo de infección diseminada por *M. chimaera* incluye a todos los pacientes sometidos a cirugía de corazón abierto con dispositivos 3T-HCU, incluyendo la colocación de válvulas cardíacas protésicas, injertos aórticos protésicos y dispositivos mecánicos de soporte circulatorio [193, 196, 217], con una propensión de diseminación sistémica [218, 219].

La mortalidad recogida para estos casos con infecciones invasivas por *M. chimaera* se encuentra en torno a 40%-50% [216, 220]. Una investigación retrospectiva de 30 casos en Reino Unido, reportó una mortalidad del 60%, con una supervivencia estimada en 5 años del 45%, siendo datos de supervivencia notablemente más bajos respecto otros estudios de cirugía cardíaca que involucran a mayor número de pacientes (supervivencia de 75% a 95% a 5 años) [221, 222].

1.3. Infección nosocomial por *Pseudomonas aeruginosa*

1.3.1. Aspectos generales del microorganismo

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram-negativo, aerobio, capaz de crecer a en un amplio rango de temperaturas entre 20°C y 42°C, aunque su temperatura óptima oscila entre los 30°C y 37°C [223].

P. aeruginosa rara vez es miembro de la flora microbiana normal en humanos, aunque estudios concretos han reportado ~8.2% en individuos sanos [224]. La tasa de colonización en sitios específicos suele variar, en muestras fecales suele ser en torno a 2.6-24%, siendo menores las tasas de colonización de otros lugares: 0-2% en la piel, 0- 3,3% en la mucosa nasal y 0-6,6% en la garganta [225]. La tasa de colonización aumenta al 50% en los individuos inmunosuprimidos u hospitalizados, particularmente en aquellos con ingresos prolongados [225]. Como situación excepcional, los pacientes con fibrosis quística crónica tienen una predisposición del 80% de adquirir una infección por *P. aeruginosa* [226].

P. aeruginosa puede ocasionar diversos tipos de infecciones. En EE. UU, los datos del Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales durante el periodo 1986–2003 indicaron que la infección por *P. aeruginosa* fue la segunda causa más común de neumonía (18.1%), la tercera causa más común de infección del tracto urinario (16.3%) y el octavo patógeno aislado con mayor frecuencia del torrente sanguíneo (3.4%) [227]. El tipo de infección que puede causar *P. aeruginosa*, ya sea aguda o crónica, es independiente de su genotipo, por lo que se relaciona principalmente con los factores del huésped y la forma de colonización de la bacteria [228].

Desde el punto de vista de la patogénesis, en relación con el paso desde un estatus de colonizado al de infectado, se conoce que el espacio bronquial es el nicho ecológico ideal para la colonización bacteriana por *P. aeruginosa*. Este microorganismo posee sistemas de comunicación de célula a célula (quorum sensing) que modulan la expresión génica y la formación de biopelícula [229], lo que

facilita su capacidad de colonizar conduciendo a respuestas inflamatorias locales inespecíficas que pueden deteriorar la función pulmonar y desencadenar una bacteriemia o a evadir el sistema inmunitario del huésped, derivando a infecciones crónicas [230, 231].

1.3.2. Resistencia antimicrobiana

P. aeruginosa presenta una característica relevante que la convierte en un patógeno nosocomial de riesgo; su resistencia intrínseca a los antibióticos debido a una baja permeabilidad en la membrana externa que justifica su persistencia y éxito infectivo [232]. Cuando se somete a presión selectiva por antibióticos, la respuesta inducida facilita la supervivencia bacteriana y el desarrollo de resistencia a los antibióticos [232]. La selección del antibiótico más apropiado es un desafío terapéutico constante, debido a la capacidad del patógeno de desarrollar resistencia a múltiples agentes antimicrobianos, incluso durante el tratamiento de una infección [233]. La terapia contra la infección por *P. aeruginosa*, se basa en el uso de diversos agentes antimicrobianos como la penicilina, imipenem, ceftazidima, ciprofloxacina y tobramicina, cefalosporinas, colistina, carbapenems y terapias combinadas [234].

La resistencia antimicrobiana de *P. aeruginosa* es un problema de salud mundial grave debido al creciente desarrollo de cepas multirresistentes (MDR) y de resistencia extendida (XDR), según los criterios de resistencias definidos por el CDC/ECDC [235]. En un estudio nacional realizado en EE. UU en pacientes de UCI entre el período 1993 a 2002, se observó un aumento de 3 veces en las tasas de resistencia a múltiples fármacos, del 4% en 1993 al 14% en 2002 [236]. De modo equivalente, en Cali, Colombia (1996-2003), se registró un incremento de resistencias en *P. aeruginosa* del 2% a más del 40% en esos 7 años [237]. Incluso en entornos hospitalaria en Lituania con valores basales de resistencia muy elevados del 53%, se ha observado un incremento hasta el 88% [238]. Estas

dinámicas obligan a monitorizar la sensibilidad a antimicrobianos y seleccionar regímenes de tratamiento empírico para mitigar el aumento de resistencia.

1.3.3. Infección por *P. aeruginosa*

La capacidad de *P. aeruginosa* para crecer en condiciones mínimas de nutrientes le permite colonizar gran variedad de nichos ecológicos, así como, persistir en el ambiente de forma prolongada, lo que la convierte en un microorganismo con alto potencial para la infección nosocomial [239]. *P. aeruginosa* puede persistir en objetos durante años, aunque son las manos su principal reservorio, así como, las superficies húmedas, tales como sumideros; se ha propuesto que el aire presenta un papel relevante en la propagación de *P. aeruginosa* de paciente a paciente [240-243]. Se trata, por tanto, de un patógeno que puede causar infecciones a partir de instrumentos quirúrgicos, como catéteres, estetoscopios y drenajes, y colonizar el circuito de aguas hospitalarias, al que se adhiere formando biopelículas complejas de difícil eliminación [225].

La frecuencia de transmisión nosocomial de *P. aeruginosa* varía según la epidemiología de cada hospital, área geográfica, tipo de servicio, tipo de pacientes y patrón de uso de antibióticos. Así se describen cifras del 7.1% en EE. UU, 9.62% en España, 7.9% en el Reino Unido y 14.91% en China [171, 244-246].

La mortalidad debido a la infección oscila en torno al 30-40%, según la localización de las infecciones, el pronóstico de la enfermedad de base, la gravedad clínica inicial y el tratamiento antibiótico empírico [247].

1.3.4. Caracterización molecular

Debido a los aspectos mencionados y por su asociación con resistencia, en la actualidad, *P. aeruginosa* es uno de los microorganismos de mayor impacto en salud pública que justifica la existencia de numerosos estudios enfocados a caracterizar la infección, analizar la resistencia, describir brotes e implementar

herramientas moleculares para mejorar el conocimiento de sus dinámicas y rutas de transmisión [248, 249]. Los sistemas de análisis moleculares de este microorganismo, dirigidos a la identificación de clones circulantes y a la definición de clusters de transmisión ha descansado en diferentes técnicas que han evolucionado para ir aumentando la capacidad de discriminación.

1.3.4.1. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)

Se basa en la digestión controlada del ADN en el interior de una matriz sólida para generar fragmentos grandes (10 kb a 10 Mb). El ADN digerido, se separa mediante electroforesis en una cubeta especial, que aplica un campo eléctrico que cambia periódicamente de dirección, para permitir la separación por tamaños de esas moléculas grandes [250]. El proceso final permite la obtención de patrones de bandas que facilitan la comparación entre cepas. La PFGE es relativamente económica, ofrece una capacidad de discriminación y reproducibilidad intra-laboratorio razonables y la interpretación de los patrones no es compleja [251].

La técnica de PFGE es un método popularmente utilizado para investigaciones epidemiológicas a gran escala para discriminar cepas, trazar la transmisión nosocomial de paciente a paciente y la conversión de resistencia de los aislados de los pacientes. En un estudio de cohortes (2001-2006) realizado en pacientes ingresados en la UCI, se observó que 149 pacientes habían adquirido *P. aeruginosa* resistente a imipenem (IRPA). Mediante el genotipado de las cepas con PFGE se detectó que el 31% presentaban un patrón idéntico o muy parecido al de otro aislado indicando transmisión paciente-paciente. Y el 26% tenían un aislado de *P. aeruginosa* sensible (ISPA) previo al ingreso y de éstos el 79% tenían un aislado idéntico, sugiriendo que en estos pacientes las cepas endógenas habrían adquirido la resistencia a imipenem debido a la presión selectiva del tratamiento con antibióticos [252].

1.3.4.2. Análisis del número variable de repeticiones en tándem en múltiples loci (MLVA)

El MLVA consiste en la amplificación por PCR, mediante cebadores específicos [253], de diversos loci con el fin de determinar el número de repeticiones en tándem (VNTR) presentes. El análisis final conduce a un código numérico que asigna el genotipo de cada cepa.

Desde su primer establecimiento para *P. aeruginosa* [254], la técnica de MLVA ha modificado los loci analizados con el fin de aumentar su capacidad de discriminación, una mejor comprensión de la distribución del genotipo y la epidemiología de la infección [255]. En un estudio realizado de Irán en 2019, el análisis por MLVA de 70 cepas de *P. aeruginosa* procedentes de pacientes hospitalizados con infección del tracto urinario, permitió descartar una transmisión entre pacientes debido a la gran diversidad de genotipos que se encontraron entre las cepas aisladas [248].

La MLVA es una técnica altamente reproducible, poco demandante técnicamente (se dispone de kits comerciales y plataformas automatizadas a gran escala) [256], y de interpretación sencilla, bien adaptada a los requerimientos de análisis de brotes grandes y complejos y, por tanto, una buena solución metodológica a los requerimientos de Salud Pública. Hay que reconocer ciertas limitaciones en cuanto a la comparación de resultados inter-laboratorio, lo que ha dificultado su estandarización en algunos estudios [257].

1.3.4.3. Tipado mediante secuenciación de múltiples loci (MLST)

La técnica MLST es un método de tipificación bacteriana universal que se centra en la secuenciación de genes conservados (housekeeping) para llevar a cabo una asignación alélica en determinadas posiciones, con el fin de establecer una relación genética entre los aislados [258, 259]. En función de las asignaciones alélicas obtenidas en los diferentes loci se asigna un código numérico, indicativo de

un genotipo determinado. Es una herramienta muy reconocida para seguir la evolución molecular de patógenos y abordar estudios epidemiológicos globales. El método MLST se adaptó a *P. aeruginosa* por primera vez en Reino Unido (2004), aplicándolo al análisis de una colección de 143 aislados recogidos de diferentes centros y hospitales pudiendo identificarse aquellos clones epidémicos, o complejos clonales de mayor éxito [260].

A nivel técnico es una herramienta sencilla y que ofrece buena reproducibilidad entre laboratorios. La gran desventaja del MLST es su alto costo, su poder discriminativo limitado para ciertas cepas debido a que depende de genes conservados/constitutivos para establecer una relación genética entre los aislados [259].

La estandarización actual de los procedimientos, así como la existencia de bases de datos de referencia de genotipos MLST, facilitan la vigilancia global de cepas [251], permiten determinar la evolución cronológica de clones prevalentes en diferentes regiones geográficas, así como medir el impacto global de brotes locales [261].

1.3.4.4. Secuenciación de genoma completo (WGS)

La incorporación de métodos de caracterización molecular de los aislados de *P. aeruginosa* ha ampliado nuestra comprensión de las fuentes de infección nosocomial, así como de las rutas de transmisión más habituales, lo que ha mejorado nuestra capacidad para controlar y prevenir brotes nosocomiales [257, 262]. Sin embargo, la estructura clonal de *P. aeruginosa* no queda completamente diseccionada por estas técnicas moleculares, lo que impide alcanzar niveles de discriminación que garanticen cubrir las necesidades analíticas de brotes más complejos. En este sentido, el salto a la caracterización por secuenciación de genoma completo (WGS) puede dar una solución a las inevitables limitaciones presentadas por las aproximaciones moleculares. La aplicación de la WGS ha ido

en aumento para estudiar diversos patógenos en el seno de investigaciones epidemiológicas de brotes nosocomiales [263-265]. Estudios realizados por Buhl *et al.*, (2019) [266] y Ramanathan *et al.*, (2017) [267] demostraron la utilidad de WGS para definir elementos de resistencia y persistencia de cepas implicadas en brotes.

Ya hay ejemplos de la integración de aproximaciones convencionales y genómicas en tándem para comprender con mayor precisión la dinámica de un brote nosocomial por *P. aeruginosa* y así orientar con mayor precisión las medidas de control. Un estudio integrando la caracterización genómica permitió identificar la cepa de *P. aeruginosa* causante de un brote nosocomial en un área crítica de pacientes neonatos, en un marco de tiempo clínicamente relevante para ayudar al control y manejo del mismo. Guiados por los hallazgos genómicos, se instauraron medidas de higiene de manos, se sustituyó la grifería, se activó un sistema de limpieza diaria con cloro de todos los fregaderos y la detección prospectiva semanal con hisopos nasales de todos los neonatos [268].

De modo adicional, el conocimiento preciso de los genomas bacterianos aporta información adicional sobre la evolución de los microorganismos, la adaptación al nicho, el potencial infeccioso, la capacidad de adquirir resistencias, todos ellos aspectos relevantes para ampliar nuestro conocimiento en el manejo de brotes [261, 269].

A pesar de los avances indudables derivados de la entrada de la epidemiología genómica en el estudio de la transmisión nosocomial, hay que reconocer la necesidad de acceder a una infraestructura informática compleja y de abordar un análisis bioinformático, actores que aún dificultan la aplicación rutinaria de WGS en el entorno hospitalario [270].

Justificación y Organización

Esta tesis se dirige al desarrollo de estrategias de optimización del conocimiento de la transmisión de microorganismos patógenos. Se han seleccionado como objeto de estudio, *Mycobacterium tuberculosis*, como representante de transmisión comunitaria, *Mycobacterium chimaera* y *Pseudomonas aeruginosa*, como relevantes en el contexto de la infección nosocomial, por transmisión persona-persona o a partir de dispositivos sanitarios contaminados, respectivamente. Esta decisión justifica la estructura modular de la tesis, que se articula en dos capítulos, cada uno de ellos dirigido a uno de los ámbitos de estudio mencionados, a pesar de que ambos están recorridos por un mismo interés de desarrollar alternativas metodológicas de vigilancia, que aúnen epidemiología molecular, análisis genómico y desarrollo de PCRs específicas de cepa, con objeto de simplificar, reducir costes y, en definitiva, optimizar el estudio.

Capítulo I. Transmisión de *Mycobacterium tuberculosis* en entornos comunitarios complejos.

Son numerosos los estudios de epidemiología molecular en tuberculosis que han ayudado a comprender con mayor precisión las dinámicas de transmisión de esta enfermedad. Sin embargo, en el nuevo escenario globalizado de la TB, derivado de los movimientos migratorios internacionales, tenemos diversos retos que abordar, tanto analíticos, como la vigilancia de la transmisión de TB-MDR, como estratégicos, asegurando el conocimiento de las cepas circulantes en países de los que carecemos de información.

A la hora de seleccionar retos de vigilancia de la transmisión de TB hemos centrado nuestros esfuerzos en la caracterización de dos entornos complejos, representantes de realidades diferentes. El primero, Lima, Perú, con información de epidemiología molecular ya disponible, pero con necesidades de vigilancia específica de la transmisión de TB-MDR y de monitorización transnacional del posible impacto de estas cepas MDR en poblaciones europeas, receptoras de

migrantes procedentes de Perú. El segundo, Panamá, sin programas de epidemiología molecular previo, que requiere del desarrollo de nuevas alternativas metodológicas de vigilancia, adaptadas a su realidad y posibilidades. Panamá constituye un contexto geográfico singular con una influencia de movimientos migratorios única, en el que un nuevo modelo de vigilancia puede abrir posibilidades para analizar en detalle la presencia de cepas singulares.

Las líneas de trabajo ejecutadas dentro de este capítulo han dado lugar a la siguiente producción:

1. **Acosta F**, Agapito J, Cabibbe AM, Cáceres T, Sola C, Pérez-Lago L, Abascal E, Herranz M, Meza E, Klotoe B, Muñoz P, Rossolini GM, Bartoloni A, Tortoli E, Cirillo DM, Gotuzzo E, García de Viedma D. Exportation of MDR TB to Europe from Setting with Actively Transmitted Persistent Strains in Peru. *Emerging Infectious Disease* (2019). 25 (3), 596-598. <https://doi.org/10.3201/eid2503.180574>
2. Domínguez J*, **Acosta F***, Pérez-Lago L, Sambrano D, Batista V, De La Guardia C, Abascal E, Chiner-Oms A, Comas I, González P, Jaime Bravo J, Del Cid P, Rosas S, Muñoz P, Goodridge A, García de Viedma D. Simplified Model to Survey Tuberculosis Transmission in Countries without Systematic Molecular Epidemiology Programs. *Emerging Infectious Disease* (2019). 25 (3), 507-514. * **Ambos autores contribuyen igualmente.** https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/25/3/18-1593_article
3. **Acosta F**, Sambrano D, Pérez-Lago P, Norman N, Batista V, Mokrousov I, Shitikov E, Jurado J, Luque O, Garay M, Mayrena M, Solís M, Muñoz P, Bek Folkvardsen D, Lillebaek T, Goodridge A, García de Viedma D. WGS reveals a likely long-term prevalent status for a predominant Beijing strain in Colon, Panama. Manuscrito en proceso de publicación.

Capítulo II. Transmisión de patógenos relevantes en el entorno nosocomial

La transmisión de patógenos nosocomiales constituye un problema sanitario de gran impacto, que requiere asimismo de nuevos esfuerzos para optimizar su caracterización y vigilancia. La heterogeneidad de dinámicas de transmisión, persona-persona, por dispositivos sanitarios contaminados, resultado de reservorios ambientales, etc, requiere de abordajes diferentes. Con esta idea, en la presente tesis se han seleccionado dos patógenos representativos de dos modalidades diferentes de transmisión nosocomial. Primero, *Mycobacterium chimaera*, implicado en la reciente alarma global de infección emergente como resultado de dispositivos contaminados implicados en cirugía cardíaca, con la intención de desarrollar un sistema de vigilancia optimizado con un objetivo dual, rastrear infecciones que hubieran pasado desapercibidas y simplificar y optimizar la vigilancia ambiental. Segundo, *Pseudomonas aeruginosa* MDR, como representante de patógeno implicado en brotes nosocomiales de gran impacto. En este caso, los esfuerzos analíticos han sido más ambiciosos, puesto que se ha transferido la estrategia aplicada en el Capítulo 1 para la vigilancia de TB, PCRs específicas de cepa diseñadas a partir de datos genómicos, a la nueva realidad de la transmisión nosocomial por otros microorganismos, evaluando el potencial transversal de este abordaje. La producción científica generada en este capítulo incluye:

4. **Acosta F**, Pérez-Lago L, Serrano MJR, Marín M, Kohl TA, Lozano N, Niemann S, Valerio M, Olmedo M, Pérez-Granda MJ, Pérez Pérez MR, Bouza E, Muñoz P, García de Viedma D. Fast update of undetected *Mycobacterium chimaera* infections to reveal unsuspected cases. *Journal of Hospital Infection*. (2018). 100 (4), 451-455; 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.08.018>
5. **Acosta F**, Fernández-Cruz A, R. Maus S, Sola-Campoy PJ, Marín M, Cercenado E, Sierra O, Muñoz P, García de Viedma D, Pérez-Lago L. In-Depth

Study of a Nosocomial Outbreak Caused by Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Using Whole Genome Sequencing Coupled With a Polymerase Chain Reaction Targeting Strain-Specific Single Nucleotide Polymorphisms. *American Journal of Epidemiology*. 04 March 2020. <https://doi.org/10.1093/aje/kwaa025>

Objetivos

Objetivo General

Desarrollar y aplicar aproximaciones basadas en biología molecular, epidemiología molecular y análisis genómico que permitan mejorar el conocimiento de la transmisión comunitaria de *Mycobacterium tuberculosis* en entornos con complejidad socio-epidemiológica y de otros patógenos, *Mycobacterium chimaera* y *Pseudomonas aeruginosa*, relevantes en el entorno nosocomial.

Objetivos Específicos

Capitulo I. Transmisión de *Mycobacterium tuberculosis* en entornos comunitarios complejos.

1. Abordar un estudio de epidemiología molecular, apoyado en MIRU-VNTR, en un entorno de alta prevalencia de TB-MDR en Lima, Perú, caracterizando la transmisión local y evaluando el potencial impacto en poblaciones que reciben migrantes de esta zona.
2. Aplicar en Panamá un nuevo sistema de vigilancia, adaptado a países sin programas de epidemiología molecular, apoyado en herramientas de análisis genotípico de fácil implementación, para identificar las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* más prevalentes.
3. Caracterizar en profundidad, mediante análisis genómico la/s cepa/s de mayor relevancia identificadas en Panamá, definir sus nichos de transmisión y reconstruir su historia reciente.

Capitulo II. Transmisión de patógenos relevantes en el entorno nosocomial

4. Aplicar un sistema de optimización del diagnóstico de infecciones por *Mycobacterium chimaera* apoyado en herramientas moleculares para identificar infecciones que hayan pasado desapercibidas y mejorar la vigilancia ambiental.

Objetivos

5. Adaptar una estrategia de vigilancia apoyada en análisis genómico y desarrollo de PCRs específicas de cepa a la optimización de la caracterización de brotes nosocomiales por *Pseudomonas aeruginosa* MDR.

Capítulo I.
Transmisión de *Mycobacterium*
***tuberculosis* en entornos**
comunitarios complejos

Exportation of MDR TB to Europe from Setting with Actively Transmitted Persistent Strains in Peru

Fermín Acosta, Juan Agapito, Andrea Maurizio Cabibbe, Tatiana Cáceres, Christophe Sola, Laura Pérez-Lago, Estefanía Abascal, Marta Herranz, Erika Meza, Bernice Klotoe, Patricia Muñoz, Gian María Rossolini, Alessandro Bartoloni, Enrico Tortoli, Daniela María Cirillo, Eduardo Gotuzzo, Darío García de Viedma

Author affiliations: Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain (F. Acosta, L. Pérez-Lago, E. Abascal, M. Herranz, P. Muñoz, D. García de Viedma); Hospital General Universitario Gregorio Marañón Servicio de Microbiología, Madrid (F. Acosta, L. Pérez-Lago, E. Abascal, M. Herranz, P. Muñoz, D. García de Viedma); Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Lima, Peru (J. Agapito, T. Cáceres, E. Meza, E. Gotuzzo); Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru (J. Agapito, T. Cáceres, E. Meza, E. Gotuzzo); Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy (A.M. Cabibbe, E. Tortoli, D.M. Cirillo); Institute for Integrative Biology of the Cell, CEA, CNRS, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Gif-Sur-Yvette, France (C. Sola, B. Klotoe); Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Respiratorias, Madrid (M. Herranz, P. Muñoz, D. García de Viedma); Florence Careggi University Hospital, Florence, Italy (G.M. Rossolini); Careggi Hospital, Florence (A. Bartoloni)

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2503.180574>

We performed a cross-border molecular epidemiology analysis of multidrug-resistant tuberculosis in Peru, Spain, and Italy. This analysis revealed frequent transmission in Peru and exportation of a strain that recreated similar levels of transmission in Europe during 2007–2017. Transnational efforts are needed to control transmission of multidrug-resistant tuberculosis globally.

International migratory movements have created a need for cross-border surveillance of tuberculosis (TB). Monitoring the transmission of multidrug-resistant (MDR) *Mycobacterium tuberculosis* strains deserves further analysis (1). Through migration, MDR strains can become more widely dispersed; they can be exported from the 30 countries with 89.7% of the incident MDR cases (2) to lower prevalence settings.

We performed a transnational molecular epidemiology analysis of MDR TB cases covering a setting with one of the highest resistance rates in Latin America (Lima, Peru) (2) and 2 settings in Europe hosting immigrants from Peru (Florence, Italy; and Madrid, Spain) to identify incidents of cross-border transmission. We selected 60 consecutive MDR TB cases (20% of the total MDR cases in Lima) diagnosed during 2014–2015 in one of the poorest districts of Lima (San Juan de Lurigancho), which has the highest incidence of TB (193 cases/100,000 population) in Peru (3). MIRU-VNTR (mycobacterial interspersed repetitive unit–variable-number tandem-repeat) analysis (Appendix 1, <https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/25/3/18-0574-App1.pdf>) suggested a high percentage of recent transmission that included 36 (60%) of 60 isolates in 9 clusters (Appendix 2, <https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/25/3/18-0574-App2.xlsx>). A comparison of these isolates with 228 genotyped isolates from the same district 4 years earlier (3) revealed that 6 of the 9 strains actively transmitted during 2014–2015 were present in 2011 (Appendix 1 Table 1).

We then investigated whether some of these persistent MDR TB strains actively transmitted in Lima could have been exported to Europe. We used a dataset of 87 MIRU-VNTR genotypes of isolates in Florence obtained from TB cases in Peru during 2001–2010 (4) and >300 MDR genotyped isolates obtained nationwide from Italy (5). We found that 1 genotype matched between the Lima and Italy MDR datasets; this genotype corresponded to a strain (C8-LPMDR) that infected 11 persons in Florence and 2 in Milan during 2007–2017 (Appendix 1 Table 2). MDR TB strains from Lima were also found in Spain during 2003–2009. Three MDR isolates, matching 3 of the 9 MDR TB strains from Lima, were found in migrants from Peru residing in Madrid (Appendix 1 Table 1). One of these isolates corresponded to the active MDR strain circulating in Italy (C8-LPMDR).

We performed whole-genome sequencing (6) with 12 of the 17 isolates of the cross-border MDR TB cluster C8-LPMDR (7 from Florence, 2 from Milan, 2 from Lima, and 1 from Madrid). In a median-joining network analysis, these isolates were distributed along 2 branches (Figure). One branch included all the isolates from Florence. Although we lacked precise data from contact tracing to verify details regarding transmission in Florence, we were able to determine that all the Peru migrants involved came from Lima. In Florence, there is a large community of persons from Peru, which offers opportunities for interacting, such as shared residence and social gatherings. The few differences (0–2 single-nucleotide polymorphisms [SNPs]) found among these isolates strongly suggests these isolates were recently transmitted in Florence. An isolate from Lima (6068) was only 3 SNPs different from a Florence isolate, demonstrating a close genetic

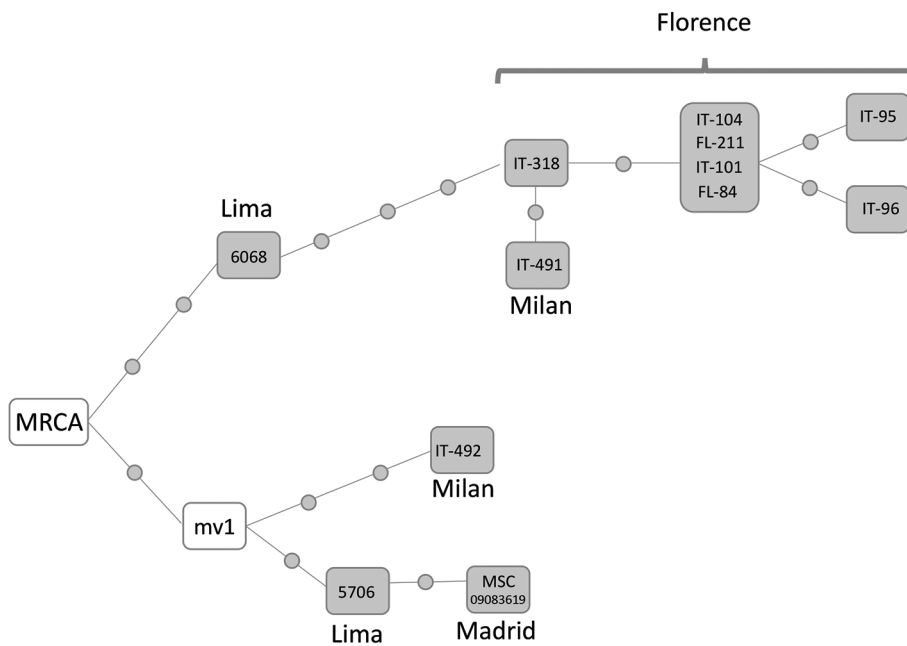


Figure. Median-joining network of whole-genome sequenced isolates of strain C8-LPMDR found in Italy, Peru, and Spain, 2007–2017. Network 4.6.1.6 (<http://www.fluxus-engineering.com>) was used to perform network analysis. Each dot along the lines linking isolates corresponds to a single-nucleotide polymorphism difference. Isolates within the same box share identical sequences. mv1 corresponds to an unsampled case inferred from the network topology. Sequences were deposited in the European Bioinformatics Institute database (<http://www.ebi.ac.uk>, accession no. PRJEB25765). FL, Florence; IT, Italy; MRCA, most recent common ancestor.

relationship between the Florence and Lima isolates. This close relationship also suggests that the starting point of this branch was an exportation event of an isolate from Lima. The second branch in the network includes 2 isolates identified in Europe (1 Madrid [city of origin unknown, data not available] and 1 Milan [origin Lima]) and 1 isolate identified in Lima. Because the most recent common ancestor is positioned between the 2 branches and the 2 isolates from Lima are in different branches, these branches probably represent 2 independent exportations of 2 variants of a strain prevalent in Lima that diversified after a prolonged period.

These data reveal that high-risk strains are being exported from Lima to 2 countries of Europe (Italy and Spain). Not only were these strains exported from Lima, but 1 strain caused a prolonged and ongoing transmission event in Italy. The transmission of this strain has caused at least 3 cases in Lima, 11 in Florence, 2 in Milan, and 1 in Madrid.

In another report, the international distribution of an MDR TB strain that caused 10 cases across 3 countries of Europe (Romania, Austria, and Germany) was investigated (7). The exportation event discussed in our report is geographically wider (intercontinental, from South America to Europe), involved more cases (17 total, with a transmission cluster of 12 cases in Italy), and occurred over a more extended period (secondary cases spanned 11 years).

Only integrative transnational efforts can provide a clearer picture of transmission of MDR TB, which has become more complex because of international migration. In this cooperative analysis involving Peru, Italy, and Spain, we detected a serious problem of active MDR TB transmission

in Lima. This situation led to a pool of persistent strains that were responsible for similar transmission events after exportation to Europe via migration.

Acknowledgments

We thank Thomas O'Boyle for proofreading the manuscript.

This project was funded by ERANet-LAC (grant nos. ELAC2015/T08-0664, E035-ERANet-LAC/J110-2016/FONDECYT, PER-2012-ELAC2015/T08-0664) and the Instituto de Salud Carlos III (grant nos. AC16/00057, FIS15/01554, 13/01207, 16/01449). L.P.-L. holds a Miguel Servet grant (no. CP15/00075). F.A. holds a grant from the Institute for the Formation and Use of Human Resources, National Secretariat of Science and Technology of Panama (no. 270-2016-293).

About the Author

Mr. Acosta is an investigator at the Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón and the Servicio de Microbiología of the Hospital General Universitario Gregorio Marañón in Madrid, Spain. His research interests include TB transmission and developing simplified tools to optimize tracking of transmission.

References

1. Zignol M, Dean AS, Falzon D, van Gemert W, Wright A, van Deun A, et al. Twenty years of global surveillance of antituberculosis-drug resistance. *N Engl J Med*. 2016;375:1081–9. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMSr1512438>
2. World Health Organization. Global tuberculosis report 2017. 2017 [cited 2018 Sep 28]. <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s23360en/s23360en.pdf>
3. Barletta F, Otero L, de Jong BC, Iwamoto T, Arikawa K, Van der Stuyft P, et al. Predominant *Mycobacterium tuberculosis*

families and high rates of recent transmission among new cases are not associated with primary multidrug resistance in Lima, Peru. *J Clin Microbiol.* 2015;53:1854–63. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.03585-14>

4. Zammarchi L, Tortoli E, Borroni E, Bartalesi F, Strohmeier M, Baretti S, et al.; COHEMI project study group. High prevalence of clustered tuberculosis cases in Peruvian migrants in Florence, Italy. *Infect Dis Rep.* 2014;6:5646. <http://dx.doi.org/10.4081/idr.2014.5646>
5. European Centre for Disease Prevention and Control. Molecular typing for surveillance of multidrug-resistant tuberculosis in the EU/EEA. 2017 Mar 6 [cited 2018 Sep 28]. <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/molecular-typing-surveillance-multidrug-resistant-tuberculosis-eueea>
6. Herranz M, Pole I, Ozere I, Chiner-Oms Á, Martínez-Lirola M, Pérez-García F, et al. *Mycobacterium tuberculosis* acquires limited genetic diversity in prolonged infections, reactivations and transmissions involving multiple hosts. *Front Microbiol.* 2018; 8:2661. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.02661>
7. Fiebig L, Kohl TA, Popovici O, Mühlendorf M, Indra A, Homorodean D, et al. A joint cross-border investigation of a cluster of multidrug-resistant tuberculosis in Austria, Romania and Germany in 2014 using classic, genotyping and whole genome sequencing methods: lessons learnt. *Euro Surveill.* 2017;22:30439. <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.2.30439>

Address for correspondence: Darío García de Viedma, Hospital Gregorio Marañón, Servicio de Microbiología, C, Dr Esquerdo 46, Madrid 28007, Spain; email: dgviedma2@gmail.com

Rectal Lymphogranuloma Venereum, Buenos Aires, Argentina

Laura Svidler López, Luciana La Rosa, Andrea Carolina Entrocassi, Dolores Caffarena, Brian Santos, Marcelo Rodríguez Fermepin

Author affiliations: Hospital Fernández, Buenos Aires, Argentina (L. Svidler López, B. Santos); Centro Privado de Cirugía y Coloproctología, Buenos Aires (L. La Rosa, D. Caffarena); Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires (A.C. Entrocassi, M. Rodríguez Fermepin)

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2503.180600>

Among 34 men with proctitis in Buenos Aires, Argentina, 16 (47%) had *Chlamydia trachomatis* infection, 11 (68.8%) of which were biovar lymphogranuloma venereum. The

outbreak was probably local, as in Europe. In Argentina, lymphogranuloma venereum should be a suspected cause of proctitis in HIV-infected men who have had unprotected anal sex with men.

Lymphogranuloma venereum (LGV) is a sexually transmitted infection caused by *Chlamydia trachomatis* serovars L1, L2, or L3 and their variants. LGV has been considered endemic to Asia, Africa, and the tropical region of South America. Over the past 2 decades, case reports of LGV in Argentina have been sporadic and regarding only patients who acquired the infection abroad.

In the Netherlands in 2003, an outbreak of rectal LGV among men who have sex with men (MSM), mainly HIV infected, was reported (1). This report was followed by many other reports from other developed countries (2,3).

LGV has been traditionally described as causing inflammation and swelling of the inguinal lymph nodes and also involving the rectum, causing acute proctitis, particularly among HIV-infected MSM (4). Since 2015, some clinicians in Argentina have suspected LGV in certain patients with proctitis (regardless of association with inflammatory tumors) in which *C. trachomatis* has been detected but not genotyped. Thus, we conducted a prospective study to assess the *C. trachomatis* genotypes as the causative agent of infectious proctitis in Buenos Aires, Argentina. Our study was conducted in a private practice and a public hospital, under a protocol previously approved by the hospital's ethics committee (no. 201723).

From September 1, 2017, through February 1, 2018, we included in our study every man who visited either the private or public study site and who had rectal signs or symptoms of proctitis and had not taken antimicrobial drugs in the previous month. None of the included patients was referred by a previously included patient. Each participant signed an informed consent form.

Over the first 5 months, we obtained a rectal swab sample from 34 men on their first visit. To detect *C. trachomatis*, we extracted DNA from the samples by using real-time PCR targeting a cryptic plasmid fragment (Alert PCR; ELITech Molecular Diagnostics, <https://www.elitechgroup.com>). Positive samples were genotyped by *ompA*-based PCR restricted fragment length polymorphism (5).

Of the 34 samples analyzed, 16 were positive for *C. trachomatis*; 11 were identified as genotype L2 and 5 as genotypes D, F, or J. All participants reported having engaged in unprotected receptive anal sex in Argentina, except for 1 who had had receptive anal sex while in Mexico. None declared having traveled to an LGV-endemic area. Mean age was 31.63 years (range 22–43 years). All

Simplified Model to Survey Tuberculosis Transmission in Countries without Systematic Molecular Epidemiology Programs

Juan Domínguez,¹ Fermín Acosta,¹ Laura Pérez-Lago, Dilcia Sambrano, Victoria Batista, Carolina De La Guardia, Estefanía Abascal, Álvaro Chiner-Oms, Iñaki Comas, Prudencio González, Jaime Bravo, Pedro Del Cid, Samantha Rosas, Patricia Muñoz, Amador Goodridge,² Darío García de Viedma²

Systematic molecular/genomic epidemiology studies for tuberculosis surveillance cannot be implemented in many countries. We selected Panama as a model for an alternative strategy. Mycobacterial interspersed repetitive unit–variable-number tandem-repeat (MIRU-VNTR) analysis revealed a high proportion (50%) of *Mycobacterium tuberculosis* isolates included in 6 clusters (A–F) in 2 provinces (Panama and Colon). Cluster A corresponded to the Beijing sublineage. Whole-genome sequencing (WGS) differentiated clusters due to active recent transmission, with low single-nucleotide polymorphism–based diversity (cluster C), from clusters involving long-term prevalent strains with higher diversity (clusters A, B). Prospective application in Panama of 3 tailored strain-specific PCRs targeting marker single-nucleotide polymorphisms identified from WGS data revealed that 31.4% of

incident cases involved strains A–C and that the Beijing strain was highly represented and restricted mainly to Colon. Rational integration of MIRU-VNTR, WGS, and tailored strain-specific PCRs could be a new model for tuberculosis surveillance in countries without molecular/genomic epidemiology programs.

Tuberculosis (TB) control depends on rapid diagnosis, efficient therapy, and control of transmission. New genotyping strategies in *Mycobacterium tuberculosis* have led to development of molecular epidemiology strategies that enable clarification of TB transmission dynamics (1–3). PCR-based molecular epidemiology approaches, namely mycobacterial interspersed repetitive unit–variable-number tandem-repeat (MIRU-VNTR), are being replaced by genomic epidemiology approaches. These approaches are based on the identification of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) using whole-genome sequencing (WGS), which offers higher discriminatory power and precision in assigning transmission clusters (4–6).

The national TB-control programs of many resource-constrained countries with a high TB prevalence lack systematic molecular epidemiology analysis (7). These countries face insurmountable obstacles to availability of genomic epidemiology programs. Panama is an example of a country that, despite recently being classified in the upper-income category, has not implemented a systematic molecular/genomic epidemiology–based surveillance program (7). The lack of such a program, together with other limitations, means that Panama now has the second highest incidence of TB in Central America and the highest TB death rate (8). The recent expansion of the Panama Canal has attracted migrants into the country, which probably

Author affiliations: Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología, City of Knowledge, Panama (J. Domínguez, F. Acosta, D. Sambrano, V. Batista, C. De La Guardia, A. Goodridge); Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Panama City, Panama (J. Domínguez, P. González, J. Bravo, P. Del Cid, S. Rosas); Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain (F. Acosta, L. Pérez-Lago, E. Abascal, P. Muñoz, D. García de Viedma); Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid (F. Acosta, L. Pérez-Lago, E. Abascal, P. Muñoz, D. García de Viedma); Centro Superior de Investigación en Salud Pública (FISABIO)–Universitat de València, Valencia, Spain (Á. Chiner-Oms); Instituto de Biomedicina de Valencia Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valencia (I. Comas); Centro de Investigación Biomédica en Red en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid (I. Comas); Universidad Complutense de Madrid, Madrid (P. Muñoz); Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid (P. Muñoz, D. García de Viedma)

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2503.181593>

¹These authors contributed equally to this article.

²These authors contributed equally to this article.

has affected host-country TB epidemiology, as reported in other settings (8–10).

The convergence of these circumstances made Panama ideal for evaluating an alternative simplified approach for optimized surveillance of TB transmission. We based our effort on a rational application of MIRU-VNTR, subsequent WGS analysis of clustered representatives, and final tailoring of allele-specific oligonucleotide PCR (ASO-PCR) for local prospective targeted surveillance of TB cases.

Materials and Methods

Study Sample

The retrospective study sample comprised 94 *M. tuberculosis* isolates from diagnostic specimens of patients with symptomatic respiratory disease (excluding those under treatment) from 19 health centers and hospitals in Panama and Colon provinces in 2015. This convenience sample comprised 80 isolates from Panama and 14 from Colon. These 2 provinces provided 660 TB cases in 2015; thus, the convenience sample represented 14.4% of TB cases from that year. Among the 91 isolates with susceptibility data, 84 (89.4%) were pansusceptible, 6 (6.4%) were monoresistant to isoniazid (2.1%) and rifampin (4.3%), and the remaining 1 (1.1%) was multidrug-resistant (MDR) (Table). We also included additional prospective isolates from Colon and Panama (January–August 2018), selected following the same selection criteria as the retrospective strain collection.

Drug Susceptibility Testing

Drug susceptibility was determined at the National Tuberculosis Reference Laboratory in Gorgas Memorial Institute (Panama City, Panama) using GenoType MTB-DRplus (Hain Lifescience, <https://www.hain-lifescience.de/en/>). We confirmed drug susceptibility results by the proportion method on Löwenstein–Jensen medium against the first-line drugs isoniazid, rifampin, streptomycin, and ethambutol. Second-line resistance was not tested in this strain collection.

DNA Extraction

DNA was extracted from Löwenstein–Jensen cultures using double-distilled water protocols from the GenoType Kit (Hain Lifescience) for first-line drug susceptibility testing. DNA for MIRU-VNTR and WGS was extracted using the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, <https://www.qiagen.com>) according to the manufacturer's protocol or the cetyl trimethylammonium bromide–based standard purification.

MIRU-VNTR Analysis

We conducted genotyping using multiplex PCR based on 24-locus MIRU-VNTR (11). DNA extraction and MIRU-VNTR typing of the retrospective sample were performed

Table. Study population, drug resistance, and genotypes of *Mycobacterium tuberculosis*, Colon and Panama provinces, Panama, 2015

Characteristic	Result*
Province	
Panama, n = 80	80 (85)
Colon, n = 14	14 (15)
Antimicrobial drug susceptibility	
Susceptible	84 (89.4)
Monoresistant	6 (6.4)
Isoniazid	2 (2.1)
Rifampin	4 (4.3)
Multidrug-resistant	1 (1.1)
No data	3 (3.2)
Lineage/sublineage	
Lineage 1	3
East African Indian	3
Lineage 2	7
Beijing	7
Lineage 4	82
Latin-American-Mediterranean	31
Haarlem	28
H37Rv-like	18
Cameroon	3
X	2
Lineage 5	1
West_African_1	1
Lineage 6	1
West_African_2	1
Distribution of clustered isolates	
Cluster A (Beijing)	7 (15)
Cluster B (Haarlem)†	14 (30)
Cluster C Latin-American-Mediterranean†	9 (19)
Cluster D (H37Rv-like)	12 (26)
Cluster E Latin-American-Mediterranean†	3 (6)
Cluster F (H37Rv-like)	2 (4)

*Values are no. (%) isolates or % isolates.

†One strain of this cluster was monoresistant to rifampin.

at Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología Laboratories (City of Knowledge, Panama). PCR products were sized using capillary electrophoresis in a 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, <https://www.thermofisher.com>). For the Beijing isolates, we added the 4 previously recommended additional hypervariable locus set (1982, 3232, 3820, and 4120) to the 24 loci MIRU-VNTR set (12). We assigned TB lineage and sublineages from MIRU-VNTR data using a lineage prediction tool (TBminer, <http://info-demo.lirimm.fr/TBminer>) (13).

WGS

WGS was performed in Hospital Gregorio Marañón (Madrid, Spain) as detailed elsewhere (14) on 2–3 representative isolates of each cluster. We generated DNA libraries following the Nextera XT Illumina protocol (Nextera XT Library Prep kit [FC-131–1024]; Illumina, <https://www.illumina.com>). Libraries were run in a MiSeq device (Illumina) by applying a paired-end reading procedure. We mapped the reads for each strain by using the ancestral *M. tuberculosis* complex genome, which was identical to H37Rv in terms of structure

but with the ancestral alleles inferred by using a maximum-likelihood approach (15). SNP calls were made with SAMtools (<http://samtools.sourceforge.net/>) and VarScan (<http://varscan.sourceforge.net/>) (coverage of at least 20-fold, mean SNP mapping quality of 20) (14,16). From the variants detected, we kept only the homozygous calls (those present at a specific position in $\geq 90\%$ of the reads). Moreover, to filter out potential false-positive SNPs attributable to mapping errors, we omitted the variants detected in repetitive regions, phages, and Pro-Glu (PE)- and Pro-Pro-Glu (PPE)-rich regions. In addition, we omitted SNPs close to insertion/deletions (10-bp window) and those in areas with an anomalous accumulation of variants (≥ 3 SNPs in 10 bp). Alignments and SNP variants were visualized and checked in IGV version 2.3.59 (<http://software.broadinstitute.org/software/igv>). A cutoff of ≤ 12 SNPs was used to consider 2 isolates as clustered due to recent transmission, as defined in Walker et al. (6). We deposited the sequences obtained in EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk> [accession nos. PRJEB23681 and PRJEB29408] and <http://bioinfo.indicasat.org.pa>).

Design of ASO-PCR

For MIRU-VNTR-defined clusters A, B, and C, we identified the strain-specific SNPs after comparing WGS data with a database containing 4,598 sequence genomes from strains circulating throughout the world (A. Chiner-Oms, unpub. data). We selected 3 strain-specific SNPs for cluster A and 4 for clusters B and C to be targeted by a multiplex ASO-PCR (Appendix Table 1, <https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/25/3/18-1593-App1.pdf>). We designed these ASO-PCRs to ensure the presence of amplification patterns, regardless of the strain analyzed. For cluster A, we designed 1 selective primer (SNP2) to target the allele found in the cluster A strain, whereas the 2 remaining primers (SNP1 and SNP3) targeted the alternative alleles, as expected in any other non-A strain. For clusters B and C, 2 primers (SNP1/SNP4 and SNP3/SNP4, respectively) targeted the alleles found in strains B and C, whereas the remaining SNPs targeted the alternative alleles. The size of the amplicons was calculated to rule out overlap and led to different band patterns in each case (Appendix Table 1). We fixed the final PCR protocols (Appendix Tables 1, 2) after evaluating multiple experimental conditions until the expected patterns for the strains surveyed and a set of different control strains were confirmed.

The ASO-PCR design and optimization were conducted in Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid, Spain). The data were transferred to be applied at the National Tuberculosis Reference Laboratory in Gorgas Memorial Institute in Panama City.

Results

MIRU-VNTR-Based Cluster Analysis

In MIRU-VNTR analysis, 47 (50.0%) of the *M. tuberculosis* retrospective isolates from Panama and Colon provinces grouped into 6 clusters, A–F. Four clusters (A–D) comprised 7–14 isolates each; the remaining 2 were smaller (E, 3 isolates, and F, 2 isolates) (Appendix Figure). Most (87%) isolates corresponded to lineage 4; 7.4% corresponded to lineage 2. Sublineages for the largest clusters corresponded to Beijing (cluster A) and Haarlem (cluster B), Latin-American-Mediterranean (cluster C), and H37Rv-like (cluster D) (Table). Clusters A and F consisted mostly of cases from Colon; the remaining 4 clusters consisted mostly of cases from Panama. Clusters A, D, and F corresponded exclusively to pansusceptible strains; clusters B, C, and E each included 1 isolate that was monoresistant to rifampin.

WGS Analysis

Representative isolates (2 each from clusters A and B and 3 from cluster C) were available for a more in-depth analysis by WGS in Madrid, Spain. The sequences obtained offered a depth of coverage of $20\times$ – $55\times$, with a Phred score >20 . The short pairwise distances (1–3 SNPs) for cluster C were consistent with recent transmission. However, 19 SNPs were found between the isolates in cluster A, and 20 SNPs were found between the isolates in cluster B, which was more consistent with the higher diversity expected for clusters involving long-term prevalent strains.

ASO-PCRs for Targeted Surveillance of Selected Clusters

Once we identified the coexistence of 1 cluster due to active recent transmission with 2 clusters that were more likely to be prevalent, ASO-PCRs were designed in Madrid with 2 objectives: 1) prioritize the targeted surveillance of the actively transmitted cluster C; and 2) facilitate capture of new cases involved in clusters A and B with the aim of completing the phylogenetic reconstruction of long-term clusters. We designed 3 multiplex ASO-PCRs to target 3 SNPs for cluster A, 4 for cluster B, and 4 for cluster C (Appendix Tables 1, 2). We used all representatives for clusters A and C and 12 of 14 of those in cluster B as positive controls, and we detected the expected amplification patterns. Forty-nine Beijing isolates other than A strain, 46 Haarlem isolates other than B strain, and 36 Latin-American-Mediterranean isolates other than C strain were also used as negative controls of the strains targeted. In all cases, the expected patterns were obtained for the non-A–C control isolates (Figure 1).

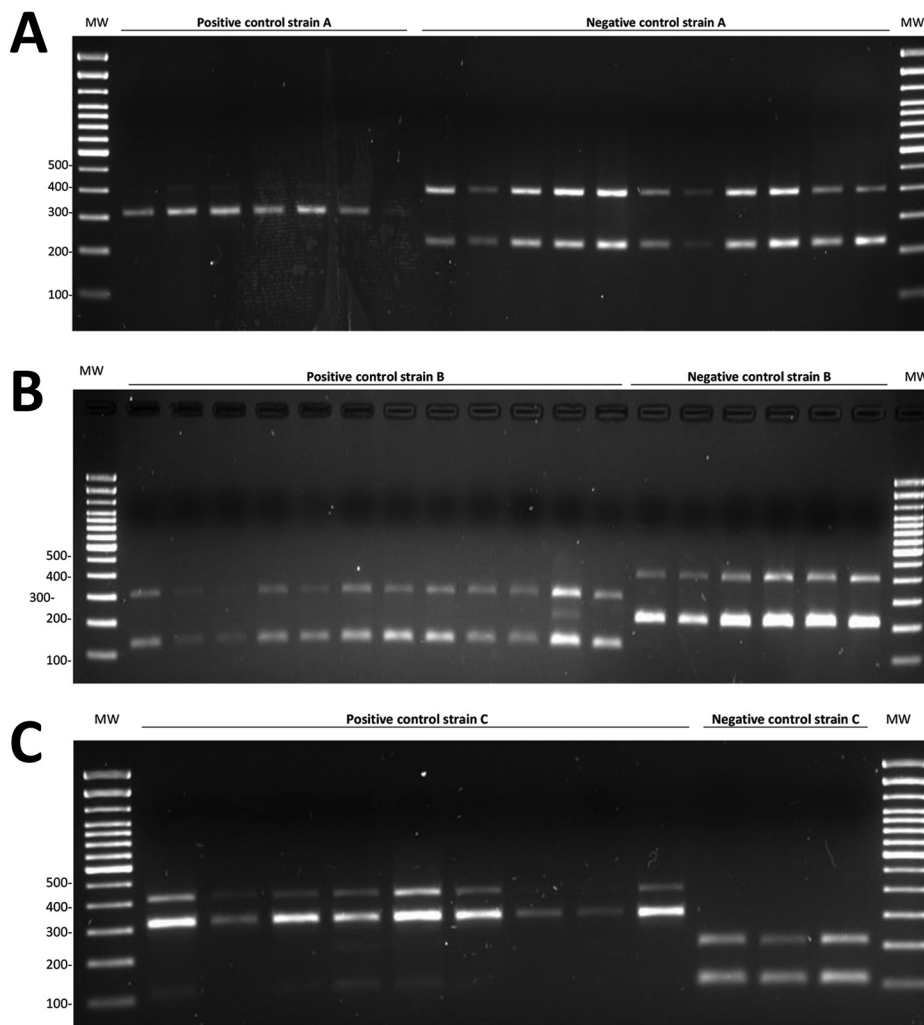


Figure 1. PCR products for allelic-specific oligonucleotide PCRs for *Mycobacterium tuberculosis* cluster A, cluster B, and cluster C strains on a selection of representative strains A, B, and C and a selection of non-A, non-B, and non-C controls. Testing was for a simplified model to survey tuberculosis transmission using data from patients and controls in Panama and Colon provinces, Panama, 2015. A) 308-bp PCR product (single-nucleotide polymorphism [SNP] 2) for strain A and 400-bp and 228-bp products (SNP1/SNP3) for non-A strain. B) 127-bp and 297-bp PCR products (SNP1/SNP4) for strain B and 209-bp and 406-bp products (SNP2/SNP3) for non-B strain. C) 307-bp and 413-bp PCR products (SNP3/SNP4) for cluster C strain and 103-bp and 207-bp products (SNP1/SNP2) for non-C strain. MW, molecular weight (100-bp DNA ladder).

Prospective Implementation of the ASO-PCR-Based Strategy

We used 51 prospective isolates from Colon and Panama collected during 2018 to evaluate the performance in situ of the 3 sets of cluster A–C–specific ASO-PCRs. The amplification patterns obtained in Madrid in the optimization step were now reproduced exactly in Panama. Cluster A PCR revealed 13 (25.5%) patients infected by Beijing strain A of the total sample, 11 from Colon, and 2 from Panama. Cluster B PCR identified 1 (1.9%) patient infected by strain B and 2 (3.9%) patients infected by strain C; all 3 of these patients were from Panama province.

All the isolates not labeled as corresponding to strains A, B, or C by the strain-specific PCRs were genotyped by VNTR. None showed a pattern corresponding to the strains targeted (they showed differences in >3 loci). This finding enabled us to rule out that we could be missing some strains related to the clusters targeted.

We used WGS to analyze all cases (except 2 for strain A) captured by the ASO-PCRs to determine the network of

relationships between the isolates (Figure 2). As expected, we observed lower SNP-based diversity acquired along a linear topology for cluster C, consistent with a sequential host-to-host recent-transmission nature for this cluster. In contrast, we found more SNPs, acquired along different branches, with several nonsampled nodes (median vectors, mv; Figure 2) for clusters A and B, more likely corresponding to prevalent strains that acquired higher diversity. In fact, for cluster A, this diversity was also detected by MIRU-VNTR; 4 isolates captured by the ASO-PCR showed single-locus variations.

Discussion

Molecular epidemiology strategies enable us to investigate TB transmission dynamics in a given population. However, to capture a true snapshot of TB transmission, these strategies require a universal, long-term fingerprinting scheme. In other words, it is necessary to ensure that transmission links are not missed because of incomplete sampling of all the TB cases in a complete population. Unfortunately, few

countries have implemented universal systematic genotyping. Many countries with more limited resources and a high TB prevalence can afford only fragmented molecular epidemiology studies based on convenience samples.

An additional concern is the recent process of substituting molecular epidemiology studies with more precise genomic epidemiology studies based on WGS analysis (4,6). If we failed to implement standard systematic molecular epidemiology in many high-prevalence areas, the gap between low- and high-income countries would widen in terms of genomic epidemiology. Therefore, we must define new strategies to offer an alternative to fill this gap.

In this study, we propose a model based on 4 stages: 1) updating the identification of strains responsible for the largest clusters in a population, 2) application of WGS to obtain more in-depth knowledge of clusters, 3) design of ASO-PCRs to identify specific strains, and 4) implementation of a simplified TB-control scheme based on targeted surveillance of predominant strains. To evaluate whether our approach could simplify detection of TB transmission in countries with no systematic molecular epidemiology programs, we applied it in Panama, a country with high TB-related mortality (8). No systematic universal genotyping is available in Panama, and the only data available are from studies of cases from a single clinic and of

MDR isolates (17,18). These studies were performed before the recent expansion of the Panama Canal, whose socioepidemiologic effect (19) can be considered similar to that of the construction of the interoceanic railroad and the Panama Canal in the mid-19th century, when large numbers of workers from Africa, India, and China arrived in Panama. High rates of malaria- and yellow fever-related deaths were associated with work on the Panama Canal (20). Regarding TB, the rates of latent infection were higher for migrant students than for US students living in the canal area (21).

The first step in our model revealed an unexpectedly high percentage of MIRU-VNTR-clustered cases. Half of the cases collected in Panama and Colon provinces grouped into 6 clusters. Fortunately, none of these clusters corresponded to resistant/MDR strains, despite the high clustering rates for MDR strains reported during 2002–2004 (17). Four of the 6 clusters identified in our study were responsible for nearly half of all cases analyzed.

Ours was a limited strain collection, and thus some transmission links might be missing because of the limited number of samples we were able to analyze, which covered only 1 year and 2 local settings, leading us to expect that the true figures for clustered cases are higher. In a previous study of a convenience pansusceptible *M. tuberculosis* strain collection

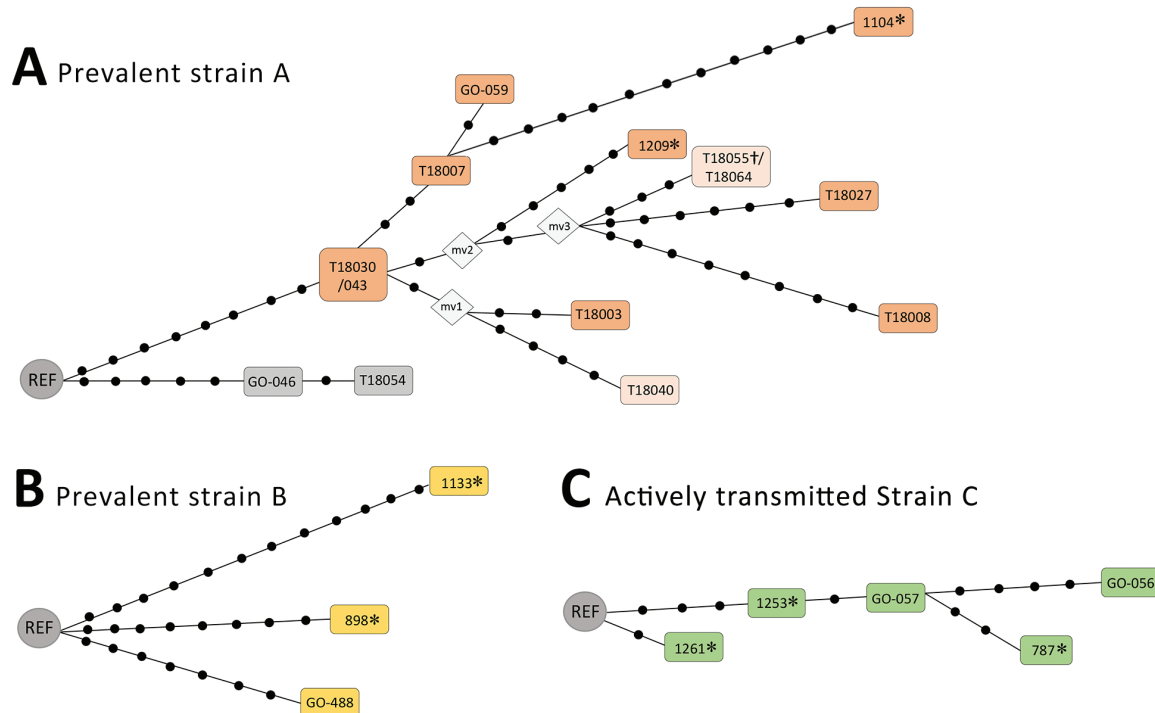


Figure 2. Networks of relationships based on whole-genome sequencing data of prevalent clusters (A, B) and active transmission cluster (C) in testing of a simplified model to survey tuberculosis transmission in Panama and Colon provinces, Panama, 2015. Each dot corresponds to a single-nucleotide polymorphism (SNP). In panel A, when 2 isolates are included in the same box, they showed no SNPs between them; the isolates within boxes with different colors show mycobacterial interspersed repetitive units–variable number of tandem repeats patterns with single-locus variations between them. mv, median vector corresponding to nonsampled nodes; REF, reference. *Isolates from 2015 used to design the allele-specific oligonucleotide–PCRs; †strain identified in an additional analysis in Madrid (out of the prospective study applying the strain-specific PCRs in Panamá). A color version of this figure is available online (<http://wwwnc.cdc.gov/EID/article/25/3/18-1593-F2.htm>).

from 2005 (18), only 21% (13/62) were found to be clustered. Direct comparisons between the figures from that study and our study cannot be made because of marked differences in genotyping approaches applied. In any case, it seems that the clustering snapshot is now different, possibly because our sampling was restricted to a more precise geographic location.

Despite the short distance (74 km) between Panama and Colon provinces, which are connected by the best highway in Panama, clusters are rich in cases from one or the other province, thus alerting us to the epidemiologic singularities of each population, with some strains more restricted to specific geographic niches. This finding is especially relevant for the Beijing sublineage (associated with high transmissibility), which seems to be better represented in Colon province.

The second step in our model focused on applying WGS to the MIRU-VNTR clusters. This analysis revealed that 2 different phenomena were co-occurring in the MIRU-VNTR-defined large clusters A, B, and C, as follows: 1) recent transmission in cluster C, robustly determined by the low diversity identified by WGS; and 2) more SNPs in clusters A and B. The higher number of SNPs within clusters A and B (more than the 12 SNPs accepted as a threshold for inferring recent transmission from WGS data) suggests that these clusters involve prevalent strains that had accumulated higher diversity after circulating for longer periods. Since it was first determined (6), the SNP-based threshold for recent transmission has been proven correct in many studies (22–25). This threshold was robust even in circumstances that could lead to greater accumulation of diversity, such as prolonged host-to-host transmission and the simultaneous involvement of reactivation and recent transmission in the same event (16).

Robustly defined MIRU-VNTR clusters corresponded to different magnitudes of SNP-based diversity between the clustered isolates; that is, clusters caused by recent transmission coexisted with other clusters not associated exclusively with recent transmission but with prevalent strains that had circulated for long periods. This observation obliges us to reinterpret the load of true recent transmission in high-prevalence settings. According to our WGS findings, our initial estimation of 50.0% of cases from recent transmission, which was based on MIRU-VNTR analysis, must be reduced. This bias in the estimation of recent transmission in MIRU-VNTR-defined clusters has been discussed (26–28). We also demonstrated how MIRU-VNTR failed to differentiate between migrants who had acquired TB by recent transmission after arrival in Spain from other patients who had imported TB from their country of origin (28). Both shared identical MIRU-VNTR patterns, and only WGS succeeded in differentiating them based on the magnitude of SNP diversity (28). From our data, it can be deduced that WGS is necessary in high-prevalence settings to differentiate MIRU-VNTR-defined clusters that

genuinely result from recent transmission from those with the involvement of long-term prevalent strains.

Because the systematic application of WGS in low-resource settings is not realistic, our tailored ASO-PCR model for targeting marker SNPs for the strains previously identified to be responsible for a large percentage of TB cases remains an affordable strategy. Our proposal reconciles the high discriminatory power of WGS (targeted SNPs are obtained from the WGS analysis) with the low-cost and easy implementation of PCR-based tools. Based on the initial MIRU-VNTR analysis, application of these 3 multiplex ASO-PCRs would have enabled us to cover 32% of all retrospective TB cases in our sample. This coverage justified the prospective evaluation to assess their usefulness and precision, the last step in the implementation of our model. Because our multiplex ASO-PCRs were designed based on WGS data from a limited size convenience sample from Panama and Colon provinces, the PCRs should be used only for surveillance in these 2 major provinces.

The limited sample of isolates obtained in 2015, which were used to tailor the surveillance strain-specific PCRs, could make the PCRs useless when moving forward because the epidemiology of TB and the composition of circulating strains changes over time. However, the application in Panama of the set of 3 ASO-PCRs on the prospective samples from Panama City and Colon enabled us to determine the strain involved in 31.4% of the cases, a figure close to the 32% of the isolates belonging to the 3 surveyed strains in 2015. This finding suggested a rather stable composition of strains in this setting.

Initially, the quality of the DNA obtained from the isolates in 2015 for the fourth predominant cluster (cluster D) was not suitable for WGS. Just recently, the VNTR analysis from the 2018 isolates not belonging to the A/B/C clusters enabled us to identify new representative cases for this cluster, which will be analyzed by WGS to tailor a new PCR to complete and extend the coverage of the surveillance panel.

Once our strategy has proved to be useful, a country-wide genotyping effort will be necessary to determine highly transmitted strains nationwide and develop new ASO-PCR tools for surveillance of the entire country. The strategy will be evaluated periodically. It will mean updating the composition of circulating strains by MIRU-VNTR analysis as soon as we detect a reduction in the proportion of incident isolates that can be labeled by the strain-specific PCRs already implemented. From the VNTR analysis, we will select the new clusters to be targeted, according either to their magnitude or to the speed in which the involved strain is transmitted. Three representative isolates from each cluster selected will be analyzed by WGS to identify the strain-specific SNPs to tailor new PCRs to target them. Therefore, the panel of PCRs applied as a surveillance tool will be constantly updated according to the changing epidemiology of the setting.

The networks of relationships obtained from WGS data of the representatives of clusters A–C captured by the ASO-PCRs were consistent with the different nature (either prevalent strains A/B or recently transmitted strain C) of the clusters analyzed. A pattern of closely related isolates (below the 12-SNP cutoff determined as similarity threshold) (6) distributed along a simple linear topology was found for cluster C. However, more complex branched topologies and a higher diversity between the isolates were observed for the prevalent clusters A and B.

A high proportion (21.5%) of patients in Colon were infected by the Beijing strain (strain A). This finding constitutes a challenging alert for the national TB-control program because this lineage is involved in long-term outbreaks, which eventually become uncontrollable. In Gran Canaria Island, Spain, the importation of a Beijing strain in the 1990s caused a major outbreak that could not be controlled. Three years after importation, 27% of TB patients on the island were infected by this strain (29). Three decades later, the strain remains highly prevalent, not only on the island to which it was imported but also on neighboring islands (30). The marked presence for the Beijing lineage in Colon province seems to be an emergent issue because the lineage accounted for only 3.7% of the cases in 2005 (18). Those authors raised the alert about the effect of the expansion of the Panama Canal on the likely modification of the composition of circulating strains. Application of only 1 of our PCRs (the one targeting the Beijing strain) would have enabled us to characterize half of all current newly diagnosed TB cases in Colon; that is, persons infected by a highly transmissible strain. This PCR could constitute a key tool for optimizing the national TB-control programs to avoid future uncontrollable situations, such as the one reported for the Canary Islands.

In summary, our study evaluated the feasibility and usefulness of a new model for simplifying and optimizing surveillance of transmission of TB in countries with no systematic molecular or genomic epidemiology program. Preliminary MIRU-VNTR analysis alerted us to a high percentage (50%) of clustered TB cases and revealed a differential distribution of clustered cases in 2 provinces within Panama. Subsequent WGS analysis showed that some of the MIRU-VNTR clusters were the result of active recent transmission, whereas others more likely resulted from prevalent long-term strains. We applied the WGS data to tailor 3 ASO-PCRs, which covered most cases in the population. The prospective application of only 3 ASO-PCRs enabled us to identify the strains infecting 31.4% of incident cases. This strategy optimized tracking of actively transmitted *M. tuberculosis* strains and capture of new cases involving long-term prevalent strains, thus making it possible to reconstruct the global phylogeny of their clusters. Our strategy also made it possible to identify

the alarming presence of the Beijing sublineage in the incident cases in Colon province. A design based on a rational integration of MIRU-VNTR, WGS, and ASO-PCR could provide a new model for surveillance of TB transmission in countries without universal molecular/genomic epidemiology programs.

Acknowledgments

We thank Thomas O'Boyle for proofreading the manuscript. We are grateful for the support of the healthcare workers who located TB patients to obtain *M. tuberculosis* isolates from Panama and Colon (Ana de Chavez, Laura Solis, Maritza Mayrena, Maybis Garay, William Teerán, Victoria Williams, Julio Jurado, Odemaris Luque, Isolina Martinez, Yaracelis Cuadra, and Luz Fruto). We thank the working group in the Clinical Microbiology section of the Gorgas Memorial Institute for its support in implementing the strain-specific PCRs in Panama.

This study received funding from: the Network of the European Union, Latin America and the Caribbean Countries on Joint Innovation and Research Activities ERANet-LAC (TRANS-TB-TRANS)(Refs AC16/00057; ELAC2015/T08-0664); Ministerio de Economía y Finanzas Panamá, Sistema Nacional de Investigadores de Panamá and Secretaría Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación (grant no. 82-2015); ISCIII (grant no. AC16/00057, grant no.FIS15/01554 and Miguel Servet to L.P.-L.[contract no. CP15/00075]); IFARHU-SENACYT (grant no. 270-2016-293) to F.A.

About the Author

Mr. Domínguez is responsible for the Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública, Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, and is adjunct faculty at the Tuberculosis Biomarker Research Unit of Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología, City of Knowledge, Panama. His research focuses on diagnosis, identification, drug susceptibility testing, and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex, as well as on the development of strategies to improve TB transmission surveillance.

References

1. Diel R, Rüsche-Gerdes S, Niemann S. Molecular epidemiology of tuberculosis among immigrants in Hamburg, Germany. *J Clin Microbiol.* 2004;42:2952–60. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.7.2952-2960.2004>
2. Allix-Béguec C, Fauville-Dufaux M, Supply P. Three-year population-based evaluation of standardized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1398–406. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02089-07>
3. Lambregts-van Weezenbeek CS, Sebek MM, van Gerven PJ, de Vries G, Verver S, Kalisvaart NA, et al. Tuberculosis contact investigation and DNA fingerprint surveillance in The Netherlands: 6 years' experience with nation-wide cluster feedback and cluster monitoring. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2003;7(Suppl 3):S463–70.

4. 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:e1001387. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1001387>
5. Homolka S, Projahn M, Feuerriegel S, Ubben T, Diel R, Nübel U, et al. High resolution discrimination of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex strains based on single nucleotide polymorphisms. *PLoS One*. 2012;7:e39855. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0039855>
6. Walker TM, Ip CL, 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;13:137–46. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70277-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70277-3)
7. Plan Estratégico Nacional para el Control de la Tuberculosis en Panamá 2018–2022. Information at the Gaceta Oficial of Panama [cited 2018 Jun 1]. <https://www.gacetaoficial.gob.pa/pdfTemp/28549/67983.pdf>
8. Tarajia M, Goodridge A. Tuberculosis remains a challenge despite economic growth in Panama. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2014;18:286–8. <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.13.0534>
9. Truzyan N, Crape B, Grigoryan R, Martirosyan H, Petrosyan V. Increased risk for multidrug-resistant tuberculosis in migratory workers, Armenia. *Emerg Infect Dis*. 2015;21:474–6. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2103.140474>
10. Sandgren A, Schepisi MS, Sotgiu G, Huitric E, Migliori GB, Manissero D, et al. Tuberculosis transmission between foreign- and native-born populations in the EU/EEA: a systematic review. *Eur Respir J*. 2014;43:1159–71. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00117213>
11. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2006;44:4498–510. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01392-06>
12. 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;52:164–72. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02519-13>
13. Azé J, Sola C, Zhang J, Lafosse-Marin F, Yasmin M, Siddiqui R, et al. Genomics and machine learning for taxonomy consensus: the *Mycobacterium tuberculosis* complex paradigm. *PLoS One*. 2015;10:e0130912. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0130912>
14. Pérez-Lago L, Comas I, Navarro Y, González-Candelas F, Herranz M, Bouza E, et al. Whole genome sequencing analysis of intrapatient microevolution in *Mycobacterium tuberculosis*: potential impact on the inference of tuberculosis transmission. *J Infect Dis*. 2014;209:98–108. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jit439>
15. Comas I, Chakravarti J, Small PM, Galagan J, Niemann S, Kremer K, et al. Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved. *Nat Genet*. 2010;42:498–503. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.590>
16. Herranz M, Pole I, Ozere I, Chiner-Oms Á, Martínez-Lirola M, Pérez-García F, et al. *Mycobacterium tuberculosis* acquires limited genetic diversity in prolonged infections, reactivations and transmissions involving multiple hosts. *Front Microbiol*. 2018;8:2661. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.02661>
17. Rosas S, Bravo J, Gonzalez F, de Moreno N, Sanchez J, Gavilan RG, et al. High clustering rates of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in Panama. *BMC Infect Dis*. 2013;13:442. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-13-442>
18. Sambrano D, Correa R, Almengor P, Domínguez A, Vega S, Goodridge A. *Mycobacterium tuberculosis* isolates from single outpatient clinic in Panama City exhibit wide genetic diversity. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;91:310–2. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.14-0134>
19. Hricko A. Progress and pollution: port cities prepare for the Panama Canal expansion. *Environ Health Perspect*. 2012;120:A470–3. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.120-a470>
20. Sanitation and the Panama Canal. *Hospital (Lond 1886)*. 1905;38:426.
21. Young RV, Pritham H. Prevalence of tuberculin sensitivity in the Panama Canal Zone. *Dis Chest*. 1963;43:172–5. <http://dx.doi.org/10.1378/chest.43.2.172>
22. Witney AA, Bateson AL, Jindani A, Phillips PP, Coleman D, Stoker NG, et al.; RIFAQUIN Study Team. Use of whole-genome sequencing to distinguish relapse from reinfection in a completed tuberculosis clinical trial. *BMC Med*. 2017;15:71. <http://dx.doi.org/10.1186/s12916-017-0834-4>
23. Casali N, Broda A, Harris SR, Parkhill J, Brown T, Drobniewski F. Whole Genome Sequence Analysis of a Large Isoniazid-Resistant Tuberculosis Outbreak in London: A Retrospective Observational Study. *PLoS Med*. 2016;13:e1002137. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1002137>
24. Tyler AD, Randell E, Baikie M, Antonation K, Janella D, Christianson S, et al. Application of whole genome sequence analysis to the study of *Mycobacterium tuberculosis* in Nunavut, Canada. *PLoS One*. 2017;12:e0185656. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0185656>
25. Lalor MK, Casali N, Walker TM, Anderson LF, Davidson JA, Ratna N, et al. The use of whole-genome sequencing in cluster investigation of a multidrug-resistant tuberculosis outbreak. *Eur Respir J*. 2018;51:1702313. <http://dx.doi.org/10.1183/13993003.02313-2017>
26. Stucki D, Ballif M, Egger M, Furrer H, Altpeter E, Battegay M, et al. Standard genotyping overestimates transmission of *Mycobacterium tuberculosis* among immigrants in a low-incidence country. *J Clin Microbiol*. 2016;54:1862–70. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00126-16>
27. Bjorn-Mortensen K, Soborg B, Koch A, Ladefoged K, Merker M, Lillebaek T, et al. Tracing *Mycobacterium tuberculosis* transmission by whole genome sequencing in a high incidence setting: a retrospective population-based study in East Greenland. *Sci Rep*. 2016;6:33180. <http://dx.doi.org/10.1038/srep33180>
28. Abascal E, Pérez-Lago L, Martínez-Lirola M, Chiner-Oms Á, Herranz M, Chaoui I, et al. Whole genome sequencing-based analysis of tuberculosis (TB) in migrants: rapid tools for cross-border surveillance and to distinguish between recent transmission in the host country and new importations. *Euro Surveill*. 2019;24:1800005. <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.4.1800005>
29. Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, Rodríguez JC, García I, Cabrera P, et al. Epidemiological evidence of the spread of a *Mycobacterium tuberculosis* strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:1165–70. <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.164.7.2101031>
30. Pérez-Lago L, Campos-Herrera MI, Cañas F, Copado R, Sante L, Pino B, et al. A *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain persists at high rates and extends its geographic boundaries 20 years after importation. *Sci Rep*. In press 2019.

Address for correspondence: Dario Garcia de Viedma, Hospital Gregorio Marañon, Servicio de Microbiología, C/Dr. Esquerdo 46 (28007), Madrid, Spain; email: dgviedma2@gmail.com; Amador Goodridge, Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología, Tuberculosis Biomarker Research Unit at Centro de Biología Molecular y Celular de Enfermedades, Bldg 208, City of Knowledge, Panama City 0843-01103, Panama; email: agoodridge@indicat.org.pa

WGS reveals a likely long-term prevalent status for a predominant Beijing strain in Colon, Panama

Fermin Acosta, Dilcia Sambrano, Laura Pérez-Lago, Anders Norman, Victoria Batista, Igor Mokrousov, Egor Shitikov, Julio Jurado, Odemaris Luque, Maybis Garay, Maritza Mayrena, Laura Solís, Patricia Muñoz, Dorte Bek Folkvardsen, Troels Lillebaek, Amador Goodridge¹, Darío García de Viedma¹

M. tuberculosis Beijing genotype strains have been associated to increased virulence, resistance and/or higher transmission rates. Our aim was to focus on a Beijing strain which had been identified in Panama, mostly in Colon, the province with one of the highest TB incidences in Panama. 24-locus-MIRU-VNTR (plus 4 hypervariable loci) analysis of 42 retrospective isolates (January-August 2018) identified a cluster including 17 (41%) Beijing representatives (BjA strain). Prospective surveillance (Sept-2018-July-2019), now supported on a strain-specific PCR targeting BjA marker SNPs confirmed the predominance for BjA strain (57%) in Colon. WGS revealed higher than expected

diversity, suggesting a long-term prevalent nature for this strain, with just a minority of cases due to recent transmission. The BjA strain belonged to the Asian African 3 (Bmyc13, L2.2.5) branch of the modern Beijing sublineage, with their closest isolates corresponding to cases from Vietnam, likely introduced in Panama between 2000 and 2012. The reasons behind its introduction and expansion in Colon would require classical epidemiology and in-depth omics analysis of both cluster and human population.

Author affiliations: Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain (F. Acosta, L. Pérez-Lago, P. Muñoz, D. García de Viedma); Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain (F. Acosta, L. Pérez-Lago, P. Muñoz, D. García de Viedma); Unidad de Investigaciones de Biomarcadores de Tuberculosis, Centro de Biología Celular y Molecular de Enfermedades-Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT), Ciudad del Saber, Panama (D. Sambrano, V. Batista, M. Garay, A. Goodridge); International Reference Laboratory of Mycobacteriology, Statens Serum Institut, Copenhagen (A. Norman, D.B. Folkvardsen, T. Lillebaek); Department of Biotechnology and Biomedicine, Technical University of Denmark, Lyngby (A. Norman); Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia (I. Mokrousov); Federal Research and Clinical Centre of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia (E. Shitikov); Caja de Seguro Social, Colón, Panama (J. Jurado, M. Mayrena); Programa de Control de Tuberculosis, Ministerio de Salud, Colón, Panama (O. Luque, L. Solís); Universidad Complutense de Madrid, Madrid (P. Muñoz); Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid (P. Muñoz, D. García de Viedma).

¹These authors contributed equally to this article.

Mycobacterium tuberculosis (MTB) complex can be subdivided in seven lineages (1) which are not equally represented geographically. Among them, the Beijing lineage (Lineage 2), has received higher attention, because its successful global distribution, its association with resistance, higher ability to compensate the loss of fitness associated to the acquisition of drug resistance, and its higher transmissibility and virulence, being involved in major outbreaks in certain settings (2-5).

The Beijing lineage constitutes at least 13% of the global MTB complex population (6). However, our knowledge about its representativity is not well balanced around the world. Since its first description in East Asia (7), many studies have helped us to determine that it is endemically prevalent in Asia (around 50% of the circulant strains in East Asia) (6), South Africa (27%) (8), and northern Eurasia (44.7%) (9). However, limited information about its presence and burden has been obtained from other areas. The Caribbean and Central America represents one of these areas, with only scarce information about the Beijing presence (2.1%: Guatemala) (10), due to the lack of systematic molecular epidemiology programs in the region. The few studies focused on this issue offered an average representativity of 3.5 % of the total TB cases associated to the Beijing lineage in The Caribbean countries (11), and

also described its involvement in severe outbreaks as the one reported in Guatemala (10).

Our aim in this study is to complete the information that we obtained in a previous study about the presence of this lineage in Panama (12). Although partial, with only two provinces screened, and not updated, with data corresponding to the strains isolated in 2015, the findings in this study were relevant, pointing out to the existence of a cluster including 15% of the strains, which involved a Beijing strain (Beijing strain A). As this strain was pansusceptible, it was overviewed in another study in the country, focused only on MDR TB cases (13). The only previous study offering genotypic data in Panama from non-selected strains, from a single outpatient clinic in Panama City reported a much lower percentage, 3.7% (14).

As our previous data indicated that the presence of this strain was not equivalent in the two provinces surveyed, but was mainly restricted to Colon, where the rate rose up to 21.5% (12), in this current study we focused our efforts on this province, one of the provinces in Panama with higher TB incidence rate (15).

Based on a modular strategy, combining MIRU-VNTR based typing (16), strain-specific PCRs, and whole genome sequencing, we aimed i) to update the current situation of the Beijing Strain A in Colon, ii) to evaluate the role of recent transmission for this cluster and iii) to explore the phylogeny and reconstruct the history of this strain in Panama.

Materials and Methods.

Samples

All MTB isolates collected (September 2018–July 2019) in Colon province, Panama were selected. They were cultured from Löwenstein–Jensen medium and DNA was extracted for CTAB (cetyl trimethylammonium bromide) method.

ASO-PCR method

Specific SNP alleles targeted and PCR conditions for Beijing *Mycobacterium tuberculosis* strain A were as described (12). The reaction mixes for PCR included final volume of 25 µl: HotStarTaq polymerase, 5 U/µl (1.25 µl); MgCl₂, 25 mM (0.4 µl); PCR buffer, 10x with 15 mM MgCl₂ (2.5 µl); Q solution, 5x (5 µl); Primer pool concentration (2.5 µl mix: 2µM, 6 µM, 5 µM); dNTPs, 25 mM (0.2 µl); water and DNA target. The PCR conditions was as follows: 95 °C for 15 min, followed by 27 cycles of 95 °C for 1 min, annealing 64 °C for 1 min and 72 °C for 10 min.

Genotyping and Whole Genome Sequencing

Isolates were genotyped by MIRU-VNTR based on the 24 loci-set as described elsewhere (16). For the Beijing isolates an additional set of 4 hypervariable loci were added (17). WGS on the Illumina MiSeq platform, mapping and SNP calling was performed as detailed elsewhere (12). The sequences were deposited in EMBL-EBI database.

Phylogenetic analysis

For general phylogenetic purposes we compared MIRU-VNTR types with those (>8000 isolates) included in general global MIRU-VNTR datasets and also Beijing specific databases (18-20) and SNPs from our WGS data were compared with those from global NGS collections (>9000 downloaded MTB genomes) (18, 20).

For the more specific analysis within the Beijing lineage, we compared WGS data with those from 200 strains corresponding to the subgroup L2.2.5/Asian African 3. Variants were called against the reference genome H37Rv/NC_000962.3 and a subset of L2.2.3/Asia Ancestral 3 to function as more closely related but still ‘ancient’ outgroup. This resulted in an alignment of 5809 SNPs which were used to construct a maximum likelihood phylogeny tree (in RAxML). A smaller subset (including the clade including the Panama isolates and the Vietnamese isolates) was used for aligning and identifying 858 SNP positions. Bayesian analysis of molecular sequences (BEAST) of three independent chains of 100 mio iterations (using evolutionary model: GTR, molecular clock: UCLD, population mode: GMFR Skyride) was performed. The three chains converged after about 2 mio. iterations (considered burn-in and removed) and were combined into a single dataset which was then used to construct the maximum clade credibility tree.

Results.

The analysis of a retrospective sample of 42 MTB isolates collected in Colon during 2018 by MIRU-VNTR revealed that 41% (17/41) were included in a major cluster and it corresponded to a pansusceptible Beijing strain (Cluster BJA, Table 1). For the remaining isolates, only 4 isolates were clustered, and they were distributed in different families, among them: Haarlem (24%), H37RV-like (17%), LAM (17%) and S (2.4%). Within the Cluster BJA most of the isolates (12/17) shared an identical 28-loci MIRU-VNTR pattern and 4 different SLVs were detected (two of them involving a hypervariable locus), represented by 1, 2, 1 and 1 isolates (Table 1).

A new prospective sample of the MTB isolates from 30 consecutive incident cases from Colon in 2019 was analyzed, now by applying a Strain BJA-specific PCR. The band-pattern expected for the BJA strain was obtained in 17 isolates (57%).

Thirty BJA isolates were analyzed by WGS, and 26 (including 2 isolates obtained in 2015) offered enough coverage depth (>20X) to call SNPs and determine the network of relationships between them (Figure 1). We observed a marked SNP-based diversity, with most of the isolates accumulating long pairwise genetic distances and distributed along different branches. The maximum SNP-distance was 38 SNPs and the median shortest SNP distance between two strains was 5 SNPs. Five non-sampled nodes

RESEARCH

Table 1. 28-loci MIRU-VNTR genotypes of Beijing *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Colon province, Panama.

MIRU-VNTR loci*																								Hypervariable loci					Total no. isolates
MIRU 02	VNTR 42	VNTR 43	MIRU 04	MIRU 40	MIRU 10	MIRU 16	VNTR 1955	MIRU 20	VNTR QUB11b	VNTR ETR-A	VNTR 46	VNTR 47	VNTR 48	MIRU 23	MIRU 24	MIRU 26	MIRU 27	VNTR 49	MIRU 31	VNTR 52	VNTR QUB-26	VNTR 53	MIRU 39	VNTR 4120	VNTR 3232	VNTR 1982	VNTR 3820		
2	4	4	2	3	3	3	5	2	6	4	4	4	2	5	1	7	3	3	5	3	8	2	4	10	13	8	11	12	
2	4	4	2	3	3	3	5	2	5	4	4	4	2	5	1	7	3	3	5	3	8	2	4	10	13	8	11	1	
2	4	4	2	3	3	3	5	2	6	4	4	4	2	5	1	7	3	3	5	3	8	2	4	10	14	8	11	2	
2	4	4	2	3	3	3	5	2	6	4	4	4	2	5	1	7	3	3	5	3	8	2	4	10	13	8	9	1	
2	4	4	2	3	3	3	5	2	6	4	4	4	2	5	1	7	3	3	5	3	8	2	3	10	13	8	11	1	

*MIRU-VNTR, mycobacterial interspersed repetitive units–variable number of tandem repeats; ETR, exact tandem repeats; QUB, Queens University of Belfast. single locus variants (SLV) are highlighted in grey.

(median vectors) were detected. Some small subgroups within the network shared shorter pairwise genetic distances (2-7 SNPs) and only two pairs of isolates shared 0 SNPs between them.

Phylogenetic Analysis

Firstly, we compared the MIRU-VNTR 24 data with those in MIRU-VNTRplus. The pattern more frequently found for the BJA strain in Colon corresponded to the MLVA type 1048-33, while the 2 less frequent SLVs (Table 1) corresponded to the MLVA types 1048-32 and 342-33. Secondly, we searched for these 3 MLVA types in a compiled 24 MIRU-VNTR dataset of 4987 Beijing isolates and found (Table 2) that MLVA type 1048-33 was scarce, only 5 entrances and remarkably 2 of them form Panama; 1048-32 was more frequent, 158 isolates widely distributed in Asia and with some entrances from Latinamerica and finally 342-3 was only poorly represented (12 isolates).

A SNP-based analysis based on the WGS data obtained from the BJA cluster showed that it corresponded to the modern Beijing sublineage, and, more specifically, to its Asian African 3 (Bmyc13; L2.2.5) (Figure 2). The entrances showing relatedness with the BJA strains in our study corresponded to isolates from Vietnam. Then we selected the currently publicly available sequenced strains corresponding to the MTBC Beijing subgroup L2.2.5/Asian African (around 200 strains) to construct a maximum likelihood phylogeny that grouped, again, the BJA Colon representatives with strains isolated in Vietnam (Ho Chi Minh city), with a strong bootstrap support (96%).

The next step (Figure 3) was to focus on a smaller subset corresponding to the clade including the BJA Panama isolates and the Vietnamese isolates to calculate by BEAST analysis that they converged to a time point between 2000–2012. The resulting median substitution rate was estimated to 4.0×10^{-7} [95% HPD 2.75×10^{-7} - 5.11×10^{-7}], which corresponds to 1.6 subs/genome/year (95% confidence interval 1.1 - 2.0/year).

Table 2. Comparison of Beijing *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Colon with patterns from MIRU-VNTR database and different clonal complex (CCs) of Beijing lineage classified from a worldwide collection (n = 4,987) as described Merker et al., 2015 (18).

MLVA types (n: isolates)	Clonal complex (modern Beijing)	Entrances with the same MLVA types (countries and representativity)
1048-33 (10 isolates)	CC3	5 isolates: Panama (2/5), Vietnam (1/431), Nepal (1/93) and Denmark (1/15)
1048-32 (1 isolate)	CC3	158 isolates: China (38/549), Vietnam (21/431), Peru (20/78), USA (19/787), Nepal (18/93), Mexico (10/89), Cambodia (7/35) and other countries with < 5 isolates reported
342-33 (1 isolate)	CC4*	12 isolates: Singapore (5/81), India (3/60)

MLVA: Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis from MIRU-VNTRplus database (<https://www.miru-vntrplus.org/MIRU/aboutus.faces>). * This shows some deficiency in their CC subdivision.

Discussion

Panama, due to its key geographic and strategic location, has received many influences from a diversity of geographic origins, which have likely impact on the composition of circulating MTB strains. However, only single, discontinuous efforts have been done to genotypically characterize the MTB isolates, mainly on convenience samples (13, 14).

To give an answer to the limitations in the country to perform systematic molecular epidemiological program we implemented a novel strategy based on i) fast MIRU-VNTR based snapshot of the most abundant strains ii) targeted WGS on these major clones and iii) tailoring specific strains to identify marker SNPs for the prevalent strains (12). Thanks to this strategy we identified 6 strains as responsible for 50% of the cases in Panama City and Colon. Not all these six strains were equally distributed between the 2 settings, and remarkably, one of them, corresponding to the Beijing lineage

was mainly restricted to Colon.

Ours propose in this current study was to perform a more in-depth analysis of this Beijing strain (Strain BJA), now exclusively focused on the city in which it was specially present, Colon. Just a standard characterization by MIRU-VNTR on a small retrospective sample of isolates alerted us

that the true figures were higher than the 7% observed from our previous convenience sample. Indeed, more than 40% of the Colon isolates in 2018 corresponded to the strain BJA; and additional prospective labelling efforts, now based on the

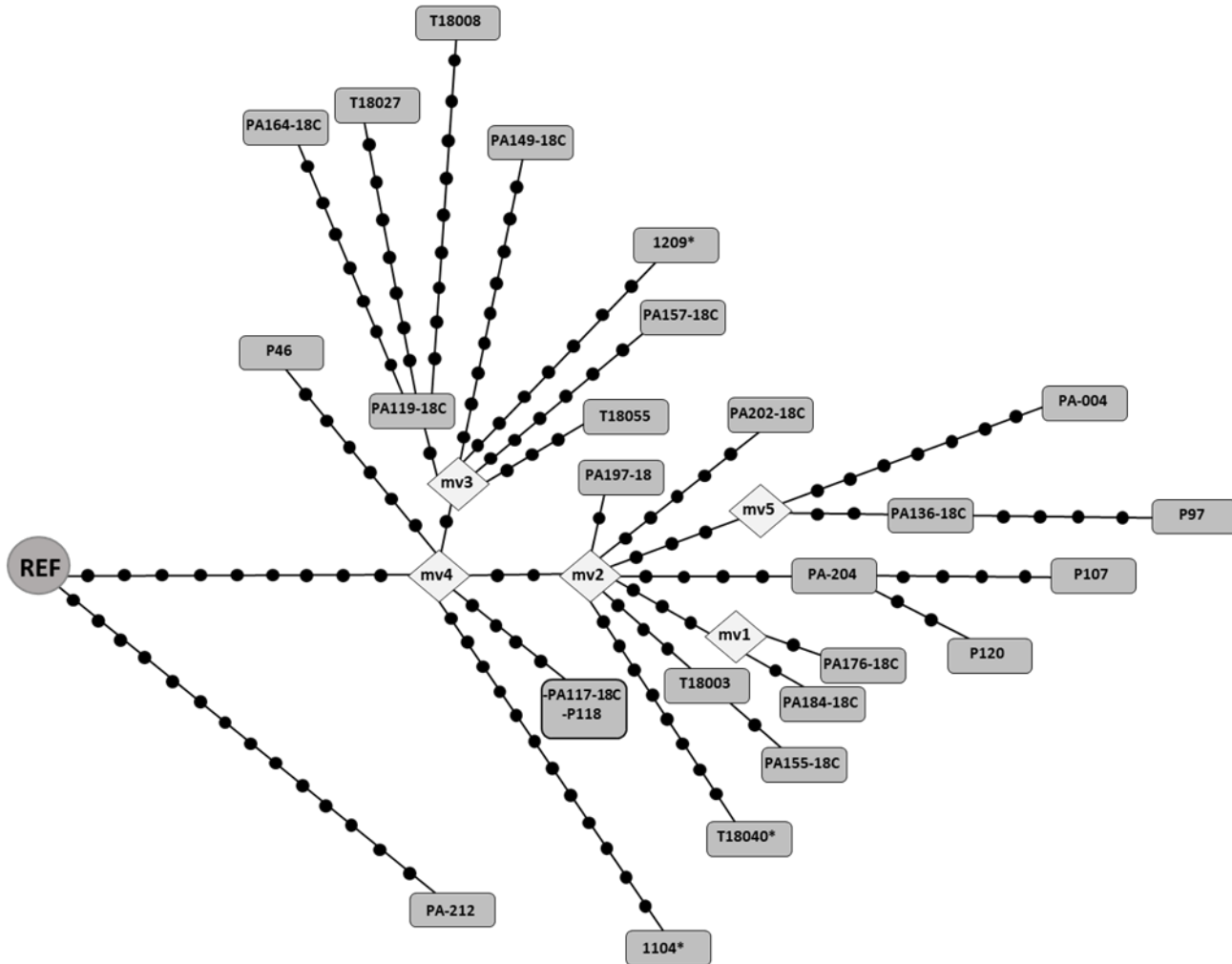


Figure 1. Network of relationships based on whole-genome sequencing data. Each dot corresponds to a single-nucleotide polymorphism (SNP). When 2 isolates are included in the same box, they showed no SNPs between them; mv, median vector corresponding to nonsampled nodes; REF, reference. *Isolates from 2015

strain-specific PCR, rose this value up to the 57% for the incident cases in Colon in 2019. Fortunately, most of the isolates were pan-susceptible, with only 4.8 % of isolates rifampicin resistant.

Our first interpretation was that the high representativity for the BJA strain was due to a non-controlled recent transmission event in Colon. Beijing strain have been widely described to be responsible for major outbreaks (5, 21-23). Colon constitutes a setting with high rates of poverty, overcrowded and substandard households and a high coinfection with HIV, all factors consistent with likely active MTB transmission. However, WGS analysis of

all the 26 BJA representatives revealed a higher than expected SNP-based diversity, beyond the diversity thresholds defining transmission clusters (24) and with only a minority of cases likely due to recent transmission.

Our findings indicated, firstly, the well described homoplasmy in MIRU-VNTR based typing, specially for the Beijing lineage (25-28), which was revealed by the higher discriminatory power of WGS cluster, as described for other settings (29, 30).

Secondly, our data allowed to reinterpret the BJA strain, from a strain involved in a recent transmission running event to a more likely long-term prevalent cluster,

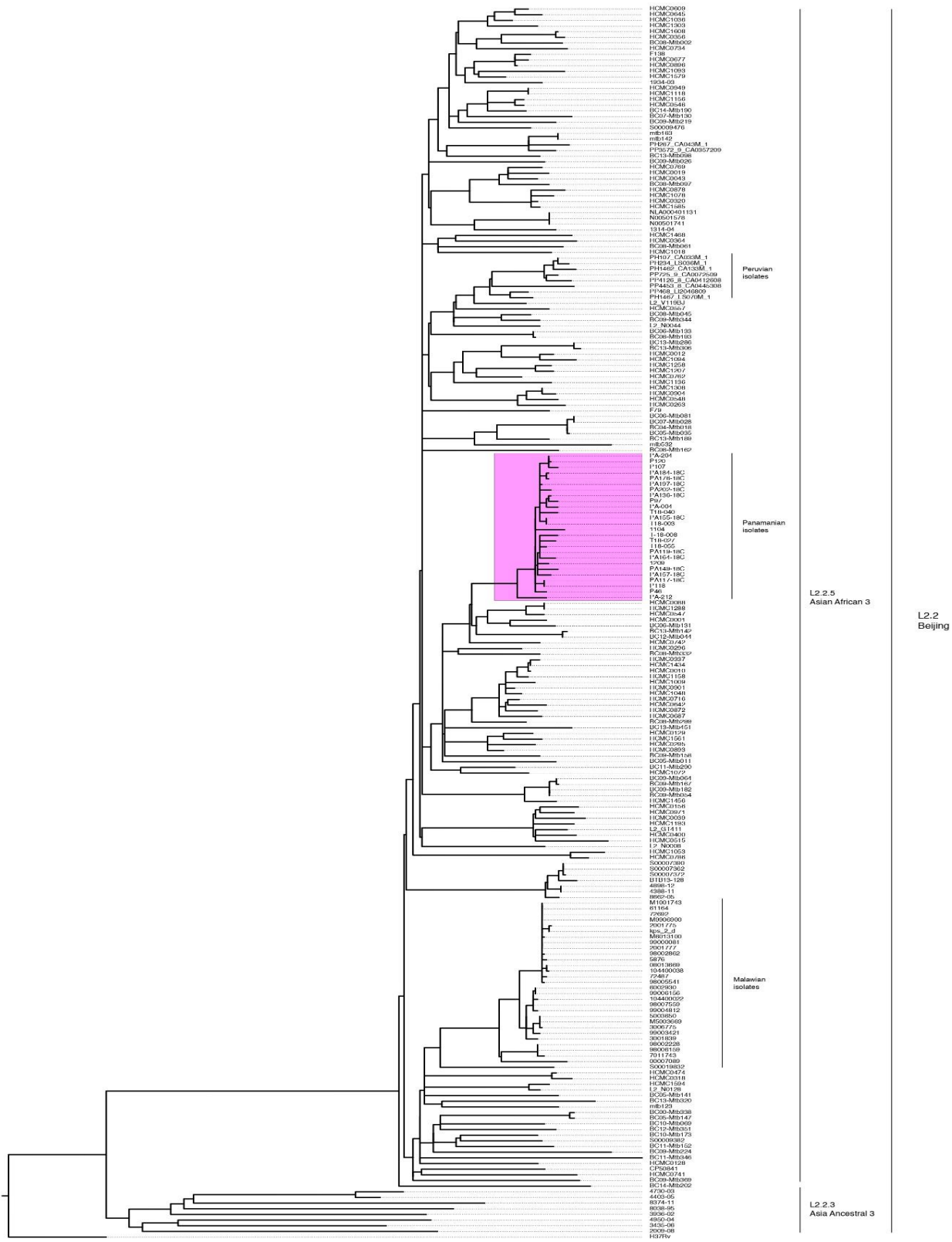


Figure 2. Phylogenetic reconstruction of the Beijing isolates from Panama. Maximum-likelihood phylogeny inferred from 5809 variable single nucleotide positions (SNP) of the 26 isolates rooted with the reference strain H37Rv (NC_000962.3). The most recent common ancestor “genome” was constructed and compared with the modern and ancestral Beijing strains dataset.

with just a minority of cases due to recent transmission.

The new long-term nature for the BJA strain revealed by WGS data led us to redirect our efforts from our initial molecular epidemiology purposes, to track recent

transmission that deserved to be controlled, to a phylogenetic interest to try to explain the reasons behind its predominance in Colon. Beijing lineage is widely distributed, with higher representativity in Russia, Vietnam,

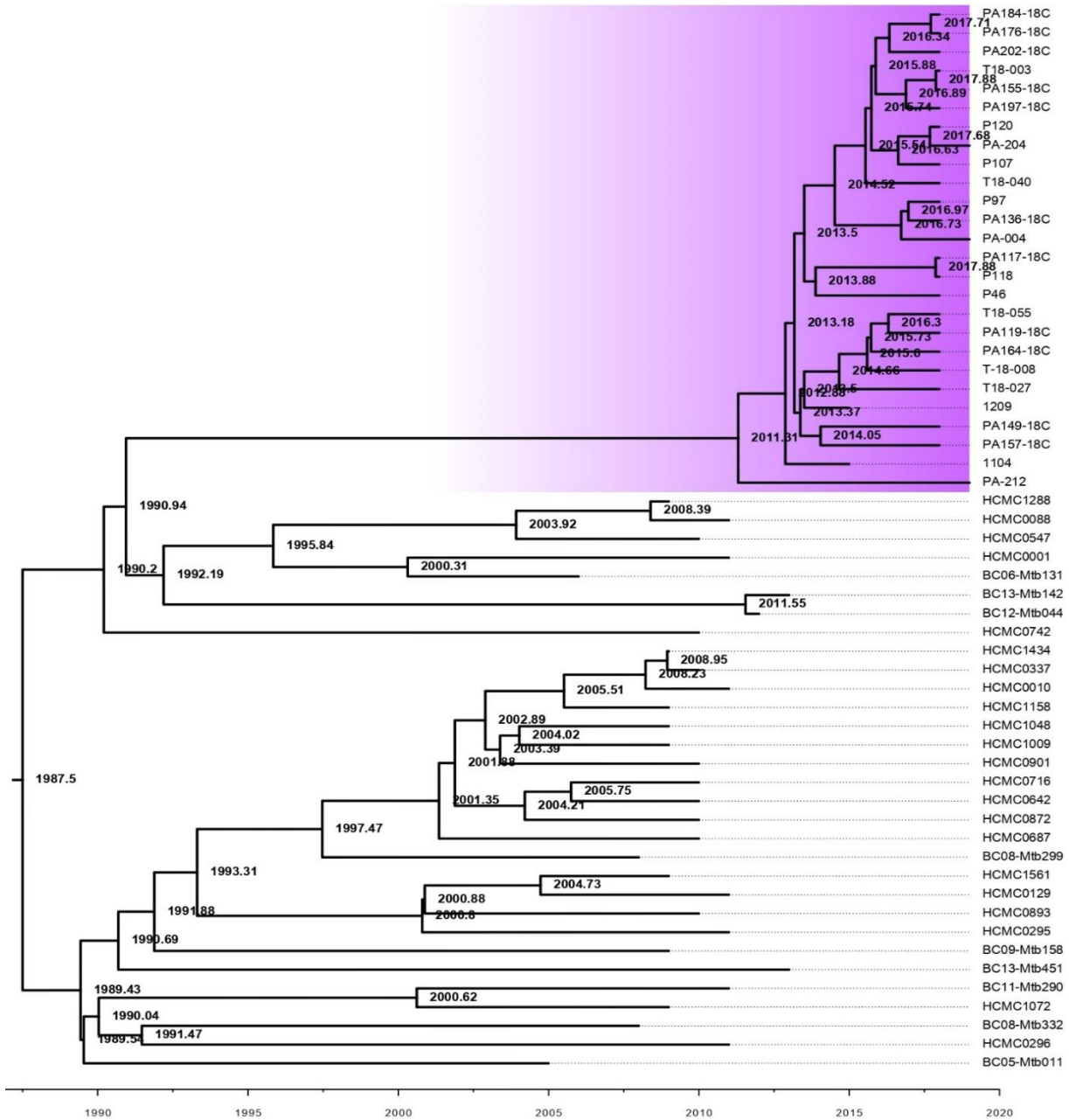


Figure 3. Bayesian Evolutionary Analysis (BEAST) to estimated time of circulation of Beijing strain in Panama. Maximum Likelihood tree inferred from 858 variable single nucleotide positions (SNP) of Panama clade groups (26 isolates) with strains isolated in Vietnam (Ho Chi Minh city) and British Columbia (most likely foreign born from South-East Asia), bootstrap support (96%). Node ages are indicated in years with 95% HPD ranges.

China, and South Africa (31) which means that the first step should be to identify which is the most likely geographical origin for the BJA strain now detected as predominant in a Panamanian city.

A MIRU-VNTR and SNP based comparison with global datasets allowed us to position BJA strain in the Asian African 3 branch of the modern Beijing sublineage (L2.2.5), a sublineage which has been mainly reported in

East Asia (18, 20, 32). The modern Beijing sublineage is considered more virulent and with a higher mutation rate than the ancestral Beijing (4). A more in-detail analysis of our WGS data allowed us to locate the BJA representatives close to isolates from the same sublineage isolated in Vietnam, with a strong bootstrap support (96%). It means that we can be fairly confident that the origin was located in Southeast-Asia, probably from a non-predominant strain, as the representativity for L2.2.5 in studies well fed in strains from Vietnam (20)(19) was really scarce (0.7%). Our analysis allowed us to estimate in 1.6 the rate of substitutions per genome per year for the BJA strain which was fairly high for the average substitution rates in MTB, and slightly higher than Eldholm *et al.* determined in a similar dataset (85 Beijing isolates), but still consistent with the normally elevated substitution rates observed throughout the Beijing lineage (33).

The global spread of the Beijing lineage has been associated with migration events for decades. The introduction from Liberia to Gran Canaria Island (Spain) in 1993, responsible for its fast-subsequent spread in the Canary Islands (22) and the importation to USA from Asia (3, 34) are examples for recent importations.

In other settings the introduction of the Beijing lineage was due to some historical event. In Peru, where the Beijing strain represents around 9% of the TB cases in certain settings, it was likely imported by the Chinese migrants in the mid-19th century for economic and political reasons (5). Similarly, the most obvious historical single event that could have justified the entrance of an inedit MTBC lineage in Panama is the massive migration from abroad to assure the workload required for the construction of the Panama Canal. However, the origin from this migration was other than Vietnam, mainly coming from France, China and India (35). In addition, our analysis indicated that the BJA strains converged to a time point between 2000 – 2012, while the MRCA between Panama and Vietnam strains has a time interval of 1987 – 1995. This means that, the BJA strain must have been introduced into the region sometime after 2000 (and most likely just before 2012), far more recently than the Canal construction, in the 19th century, and before the more recent expansion of the canal in 2015.

We should also consider that the location of Panama, at the isthmus between North and South America has constituted a constant interaction among people from many different origins. The majority (~85%) of the Panamanian population are product of the migration between Asian descendent/ancestor, European and American (36), meaning that there were plenty of opportunities for this introduction to happen, more than trying to identify a single major historical event as responsible for BJA introduction.

In summary, an alternative analytical strategy, adapted to the lack of a systematic genotyping program in Panama, based on MIRU-VNTR and strain-specific PCRs allowed to identify a setting in Panama with an extraordinary high

presence of the Beijing lineage. WGS analysis was instrumental to interpret correctly the reasons for this predominance, ruling out the role for a recently transmission non-controlled event and revealing a long-term nature for this lineage. Phylogenetic analysis pointed out to a not too remote in time importation from Southeast Asia of a not well represented isolate from the Modern Beijing sublineage. The precise reasons behind the introduction of this Beijing strain and expansion in Colon would require classical epidemiology and in-depth-omics analysis of both cluster and human population.

Acknowledgements

This study received funding from: the Network of the European Union, Latin America and the Caribbean Countries on Joint Innovation and Research Activities ERANet-LAC (TRANS-TB-TRANS) (Refs AC16/00057; ELAC2015/T08-0664); Sistema Nacional de Investigadores de Panamá and Secretaría Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación (grant no. 82-2015); ISCIII (grant no. AC16/00057, grant no. FIS15/01554; grant no. 18/00599; grant no. 19/00331 and Miguel Servet to L.P.L.[contract no. MS15/00075]); IFARHU-SENACYT (grant no. 270-2016-293) to F.A.

References

1. Gagneux S. Genetic diversity in Mycobacterium tuberculosis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;374:1-25.
2. Borrell S, Espanol M, Orcau A, Tundo G, March F, Cayla JA, et al. Factors associated with differences between conventional contact tracing and molecular epidemiology in study of tuberculosis transmission and analysis in the city of Barcelona, Spain. *J Clin Microbiol.* 2009 Jan;47(1):198-204.
3. Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, Kreiswirth BN. Global dissemination of the Mycobacterium tuberculosis W-Beijing family strains. *Trends Microbiol.* 2002 Jan;10(1):45-52.
4. Yang C, Luo T, Sun G, Qiao K, Sun G, DeRiemer K, et al. Mycobacterium tuberculosis Beijing strains favor transmission but not drug resistance in China. *Clin Infect Dis.* 2012 Nov;55(9):1179-87.
5. Iwamoto T, Grandjean L, Arikawa K, Nakanishi N, Caviedes L, Coronel J, et al. Genetic diversity and transmission characteristics of Beijing family strains of Mycobacterium tuberculosis in Peru. *PLoS One.* 2012;7(11):e49651.
6. Parwati I, van Crevel R, van Soolingen D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype strains. *Lancet Infect Dis.* 2010 Feb;10(2):103-11.
7. van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT,

RESEARCH

Traore H, Portaels F, et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol.* 1995 Dec;33(12):3234-8.

8. Gandhi NR, Brust JC, Moodley P, Weissman D, Heo M, Ning Y, et al. Minimal diversity of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains, South Africa. *Emerg Infect Dis.* 2014 Mar;20(3):426-33.

9. Mokrousov I, Vyazovaya A, Otten T, Zhuravlev V, Pavlova E, Tarashkevich L, et al. *Mycobacterium tuberculosis* population in northwestern Russia: an update from Russian-EU/Latvian border region. *PLoS One.* 2012;7(7):e41318.

10. Saelens JW, Lau-Bonilla D, Moller A, Medina N, Guzman B, Calderon M, et al. Whole genome sequencing identifies circulating Beijing-lineage *Mycobacterium tuberculosis* strains in Guatemala and an associated urban outbreak. *Tuberculosis (Edinb).* 2015 Dec;95(6):810-6.

11. Millet J, Baboolal S, Streit E, Akpaka PE, Rastogi N. A first assessment of *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and drug-resistance patterns in twelve Caribbean territories. *Biomed Res Int.* 2014;2014:718496.

12. Dominguez J, Acosta F, Perez-Lago L, Sambrano D, Batista V, De La Guardia C, et al. Simplified Model to Survey Tuberculosis Transmission in Countries Without Systematic Molecular Epidemiology Programs. *Emerg Infect Dis.* 2019 Mar;25(3):507-14.

13. Rosas S, Bravo J, Gonzalez F, de Moreno N, Sanchez J, Gavilan RG, et al. High clustering rates of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in Panama. *BMC Infect Dis.* 2013 Sep 23;13:442.

14. Sambrano D, Correa R, Almengor P, Dominguez A, Vega S, Goodridge A. *Mycobacterium tuberculosis* isolates from single outpatient clinic in Panama City exhibit wide genetic diversity. *Am J Trop Med Hyg.* 2014 Aug;91(2):310-2.

15. MINSA. Ministerio de Salud de Panamá. Análisis de Situación de Salud Panamá 2018. http://www.minsa.gob.pa/sites/default/files/publicaciones/asis_final_2018c.pdf.

16. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-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;44(12):4498-510.

17. Allix-Beguec 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;52(1):164-72.

18. Merker M, Blin C, Mona S, Duforet-

Frebourg N, Lecher S, Willery E, et al. Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. *Nat Genet.* 2015 Mar;47(3):242-9.

19. Mestre O, Luo T, Dos Vultos T, Kremer K, Murray A, Namouchi A, et al. Phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains constructed from polymorphisms in genes involved in DNA replication, recombination and repair. *PLoS One.* 2011 Jan 20;6(1):e16020.

20. Shitikov E, Kolchenko S, Mokrousov I, Bespyatykh J, Ischenko D, Ilina E, et al. Evolutionary pathway analysis and unified classification of East Asian lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep.* 2017 Aug 23;7(1):9227.

21. Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, van Soolingen D. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis.* 2002 Aug;8(8):843-9.

22. Perez-Lago L, Campos-Herrero MI, Canas F, Copado R, Sante L, Pino B, et al. A *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain persists at high rates and extends its geographic boundaries 20 years after importation. *Sci Rep.* 2019 Mar 18;9(1):4687.

23. Johnson R, Warren R, Strauss OJ, Jordaan AM, Falmer AA, Beyers N, et al. An outbreak of drug-resistant tuberculosis caused by a Beijing strain in the western Cape, South Africa. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2006 Dec;10(12):1412-4.

24. Walker TM, Ip CL, 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 Feb;13(2):137-46.

25. 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;11(10):e0163612.

26. Alaridah N, Hallback ET, Tangrot J, Winqvist N, Sturegard E, Floren-Johansson K, et al. Transmission dynamics study of tuberculosis isolates with whole genome sequencing in southern Sweden. *Sci Rep.* 2019 Mar 20;9(1):4931.

27. 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 12;4(11):e7815.

28. 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.

29. Stucki D, Ballif M, Egger M, Furrer H, Altpeter E, Battegay M, et al. Standard Genotyping

RESEARCH

Overestimates Transmission of Mycobacterium tuberculosis among Immigrants in a Low-Incidence Country. *J Clin Microbiol.* 2016 Jul;54(7):1862-70.

30. Gardy JL, Johnston JC, Ho Sui SJ, 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):730-9.

31. Mokrousov I. Mycobacterium tuberculosis phylogeography in the context of human migration and pathogen's pathobiology: Insights from Beijing and Ural families. *Tuberculosis (Edinb).* 2015 Jun;95 Suppl 1:S167-76.

32. Luo T, Comas I, Luo D, Lu B, Wu J, Wei L, et al. Southern East Asian origin and coexpansion of Mycobacterium tuberculosis Beijing family with Han Chinese. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Jun 30;112(26):8136-41.

33. Eldholm V, Pettersson JH, Brynildsrud OB, Kitchen A, Rasmussen EM, Lillebaek T, et al. Armed conflict and population displacement as drivers of the evolution and dispersal of Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Nov 29;113(48):13881-6.

34. Beijing/W genotype Mycobacterium tuberculosis and drug resistance. *Emerg Infect Dis.* 2006 May;12(5):736-43.

35. Sanitation and the Panama Canal. *Hospital (Lond 1886).* 1905 Sep 16;38(990):426.

36. Arias TC, Edgardo; Ruiz, Edward; Barrantes, Ramiro; Jorge-Nebert, Lucía; APMC. La mezcla racial de la población panameña. *Revista Médica de Panamá.* 2002;27:05-17.

Address for correspondence: Darío García de Viedma, Hospital Gregorio Marañón, Servicio de Microbiología, C/Dr. Esquerdo 46 (28007), Madrid, Spain; email: dgvedma2@gmail.com; Amador Goodridge, Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología, Tuberculosis Biomarker Research Unit at Centro de Biología Molecular y Celular de Enfermedades, Bldg 208, City of Knowledge, Panama City 0843-01103, Panama; email: agoodridge@indicat.org.pa. Corresponding authors: Laura Pérez Lago: lperezg00@gmail.com, Amador Goodridge: agoodridge@indicat.org.pa, Darío García de Viedma: dgvedma2@gmail.com.

Capitulo II.
Transmisión de patógenos relevantes
en el entorno nosocomial



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

Journal of Hospital Infection

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jhin

Short report

Fast update of undetected *Mycobacterium chimaera* infections to reveal unsuspected cases

F. Acosta^{a,b}, L. Pérez-Lago^{a,b}, M.J. Ruiz Serrano^{a,b,c}, M. Marín^{a,b,c},
T.A. Kohl^{d,e}, N. Lozano^{a,b}, S. Niemann^{d,e}, M. Valerio^{a,b,c}, M. Olmedo^{a,b},
M.J. Pérez-Granda^{a,c,f}, M.R. Pérez Pérez^{a,g}, E. Bouza^{a,b,c,h}, P. Muñoz^{a,b,c,h},
D. García de Viedma^{a,b,c,*}

^a Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain

^b Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Servicio de Microbiología, Madrid, Spain

^c CIBERES (CB06/06/0058), CIBER Enfermedades Respiratorias, Spain

^d Molecular and Experimental Mycobacteriology, Priority Area Infections, Research Centre Borstel, Borstel, Germany

^e German Centre for Infection Research, TTU-TB, Borstel, Germany

^f Cardiac Surgery Postoperative Care Unit, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

^g Servicio de Cirugía Cardíaca Infantil, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

^h Department of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 July 2018

Accepted 28 August 2018

Available online 1 September 2018

Keywords:

Heater–cooler units

Mycobacterium chimaera

Cardiac surgery

Whole-genome sequencing

SUMMARY

Mycobacterium chimaera is involved in a worldwide alert due to contaminated heater–cooler units. A real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)-based procedure was implemented to survey undetected cases of *M. chimaera* infection. PCR was negative in the 59 prosthetic heart valves from patients with PCR-16SrRNA-negative infective endocarditis. PCR identified *M. chimaera* in one of 15 clinically significant retrospective *Mycobacterium avium*–*Mycobacterium intracellulare* complex isolates, which corresponded to a patient who had undergone heart valve replacement in a different institution. Whole-genome sequencing demonstrated that he was the first case in Spain with involvement of the strain responsible for the global outbreak. These results highlight the relevance of retrospective tracking for undetected *M. chimaera* infections.

© 2018 The Healthcare Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.



Introduction

Mycobacterium chimaera is a slow-growing non-tuberculous mycobacterium that is part of the *Mycobacterium*

avium–*Mycobacterium intracellulare* complex (MAC). It is reported anecdotally as a cause of lung infection in patients with underlying lung diseases [1].

Since the description of two fatal infections due to *M. chimaera* in 2013 [2], more than 120 cases of serious invasive infection caused by this non-tuberculous mycobacterium have been reported following cardiothoracic surgery due to exposure to Stöckert 3T heater–cooler units (HCUs; LivaNova,

* Corresponding author. Address: C/Dr. Esquerdo 46 (28007), Madrid, Spain. Tel.: +34 914265104.

E-mail address: dgvedma2@gmail.com (D. García de Viedma).

London, UK), which are used during open heart surgery throughout the world [3–5].

The actual figures are expected to be far greater than reported due to three specific challenges: first, the long latency period (up to 72 months) [5] between exposure during surgery and development of symptoms; second, the non-specific signs and symptoms of these infections; and third, the difficulty achieving precise identification to species level. Identification probes, matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight and some reverse hybridization approaches fail to reach the species level with *M. chimaera*. More refined molecular approaches, such as analysis of the 16S rDNA sequence, also misidentify most *M. chimaera* as *M. intracellulare* [6].

Therefore, this study attempted to retrospectively refine the analysis of MAC isolates at the study institution in the search for undetected *M. chimaera*. In addition, the authors tried to ensure that the method selected to guarantee an accurate retrospective analysis would also guarantee a faster response in environmental surveillance, without the delays typical of culture and standard identification [6]. This strategy can be repeated easily in other institutions globally to help establish an optimized strategy to manage this emergent issue.

Materials and methods

Materials

The materials for the study included: (i) water samples (approximately 300 mL) obtained from each of the cardioplegia and oxygenator circuits from Stöckert 3T HCUs; (ii) 59 prosthetic heart valves from patients with possible or proven infectious endocarditis who required a valve replacement [these valves corresponded to those sent to the microbiology department in the study institution since 2013 to perform polymerase chain reaction (PCR)-16SrRNA, because the cases were culture negative, and were finally PCR-16SrRNA negative]; and (iii) all 15 clinically significant MAC isolates [cultured in mycobacteria growth indicator tubes (MGITs) and identified by probes from AccuProbe-Hologic (San Diego, CA, USA)] from ordinary sterile specimens since 2010. These MAC isolates had been stored at -70°C and were thawed and subcultured in Middlebrook 7H11 agar plates for the study.

Microbiological procedures

Water samples (100 mL) were decontaminated following the standard procedure used for specimens which are going to be incubated for prolonged periods to evaluate the presence of mycobacteria; briefly, 2% NaOH and N-acetylcysteine were added, incubated for 20 min, neutralized by adding pH 6.8 phosphate buffer, and finally centrifuged at 3500 g for 15 min. The pellet was cultured in both Löwenstein-Jensen and MGIT media (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) following standard procedures.

Prosthetic heart valve processing and DNA extraction were performed as indicated elsewhere [7]. The DNA used in this study was taken from the remnant purified DNA (stored at -70°C until analysis) after the 16S universal PCR.

A loopful was taken from the subcultured MAC isolates. It was suspended in water and boiled for 10 min. These crude

extracts were used as templates for the real-time PCR (RT-PCR).

HCU cleaning and maintenance procedures

All exterior surfaces were disinfected daily using Descosept biocide (Dr Schumacher, Malsfeld, Germany). Every two weeks, the water in the HCUs was substituted by new filtered water, after decontamination of the device using Puristeril 340 (Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Germany), in accordance with the manufacturer's instructions. Once each year, a complete revision of the device was performed by the company.

Genotypic analysis

Real-time polymerase chain reaction

The *M. chimaera*-specific RT-PCR developed by Zozaya-Valdés et al. was used in this study [8]. Total DNA was obtained from 100 mL of centrifuged water samples using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Prosthetic valves were sonicated and DNA was extracted as indicated [7]. MAC cultures were boiled and 2 μL from the crude extract was used.

PCR-sequence-based identification

MAC isolates were identified by PCR and sequencing of 16S rRNA and *hsp65*. Amplicons were sequenced in both directions, and sequences were compared (GenBank) using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) Program and leBIBI-QBPP database to identify species.

Genomic analysis

Libraries for whole-genome sequencing (WGS) were prepared using the Nextera XT Library Prep kit (Illumina, San Diego, CA, USA). Paired-end reads were obtained in MiSeq Illumina. Fastq files were deposited in the European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) with accession number PRJEB26584.

SNP calling in the clinical and environmental isolates

An in-house pipeline was used. Briefly, the reads of the strains were mapped against an *M. chimaera* reference strain (ZUERICH-1/DSM-44623) [9] with Burrows-Wheeler Aligner (BWA). The plasmid sequences were included within the reference. Single nucleotide polymorphism (SNP) calls were made with SAMtools and VarScan (coverage $>20\times$ and mean SNP mapping quality of 20). Alignments and SNP variants were checked using Integrative Genomes Viewer Version 2.3.59.

Integrative genomic analysis

To compare the study isolates with other *M. chimaera* strains, WGS data from published studies [9–14] were collected and analysed with a dedicated pipeline. Sequence reads were mapped to the *M. chimaera* DSM-44623 genome (NZ_CP015278.1) with the alignment program BWA, and mappings were refined with the GATK and Samtools toolkits. Samtools was used for variant detection in mapped reads, with filter thresholds of a minimum coverage of four reads in both forward and reverse orientation, four reads calling the allele with at least a phred score of 20, and 75% allele frequency.

The group and subgroup were inferred as described previously [9] with manual curation and removal in case mixed

populations were detected. For further analysis, all strains classified as belonging to group 1, for which the respective datasets reached a mean genomic coverage depth of at least 30 fold, with at least 80% of the reference genome positions complying with the thresholds of variant detection, were included.

For this set of isolates, detected variant positions were combined, supplementing the joint list with the respective information from the original mappings where necessary. SNP positions with a reliable base call (complying with the above listed thresholds for variant detection) in at least 95% of the isolates and covered in all samples, were concatenated to a sequence alignment, excluding SNPs within a window of 12 bp from each other in the same isolate.

From the aligned sequences of concatenated SNPs, homoplasious sites were identified with the recombination detection tool implemented in DNASP Version 5, and these sites were removed from the alignments (157 out of 11,979). Maximum likelihood trees were calculated using FastTree Version 2 in the double precision built, with a general time reversible substitution model, 1000 resamples and Gamma 20 likelihood optimization to account for rate heterogeneity among sites. The consensus tree was rooted with the 'midpoint root' option in FigTree, and annotated using Evolview.

Results and discussion

To fulfil the double requirement of a precise retrospective analysis of the MAC isolates and a faster response in environmental surveillance, a highly specific RT-PCR [8], based on a solid comparative genomic analysis, was selected, which led to the identification of a DNA region that was unique for this species.

Pilot application of the RT-PCR – strategy on HCUs

First, the method for fast surveillance of the four HCUs at the study institution that had not been previously checked for the presence of *M. chimaera* was evaluated. All four were positive for *M. chimaera*. The same water samples were cultured and *M. chimaera* was isolated, as confirmed by 16S and *hsp65* analysis. A monthly survey was performed after the first analysis. Two and four decontamination rounds were required to sterilize two HCUs, and the remaining two were replaced with new devices.

RT-PCR-based analysis to detect unnoticed infections

The same rapid RT-PCR approach was applied to search for potentially undetected infections involving *M. chimaera* on two study samples: (i) all 59 prosthetic heart valves from patients with culture-negative/PCR-16SrRNA-negative infective endocarditis since 2013; and (ii) all 15 clinically significant MAC isolates from ordinary sterile specimens since 2010.

PCR was negative in all 59 valves; however, a positive PCR result was obtained for *M. chimaera* from one of the 15 MAC isolates. 16SrRNA and *hsp65* analysis confirmed the results and identified a species other than *M. chimaera* within the MAC complex in 13 of the isolates (no result in one isolate).

Clinical description of the case

The *M. chimaera* isolate was obtained from a bone marrow specimen taken from a 78-year-old man hospitalized at the study institution in January 2013 with a two-month history of progressive kidney failure, increased liver enzyme levels, pancytopenia and splenomegaly. Fever was recorded at admission, but microbiological samples (including blood cultures) and transthoracic echocardiography findings were initially negative. A bone marrow aspirate performed due to progressive deterioration and pancytopenia did not reveal granulomas, and haemophagocytic syndrome was ruled out. Four weeks after the patient was admitted, a MAC isolate was obtained from the bone marrow samples. Blood and urine cultures were negative for mycobacteria. Transoesophageal echocardiography performed at the time of MAC isolation showed mitral valve vegetation, and the patient started treatment with ethambutol, clarithromycin and rifampicin, with rapid resolution of fever. Surgical treatment was considered but rejected due to the patient's terminal condition. The patient died a few days later, and permission for an autopsy was denied.

A subsequent, more detailed search of his clinical history revealed aortic valve replacement and mitral repair in January 2012 at another hospital. The HCUs at that hospital were also the Stöckert 3T model, and systematic culture of water due to environmental control policies led to isolation of *M. chimaera* (personal communication).

Genomic analysis

Low discriminative methods, namely random amplification of polymorphic DNA, failed to find matches between the environmental and patient isolates during the first outbreak reported [3]. More recently, a multi-national study [9] based on WGS found a clonal relationship between most of the isolates from patients who had undergone cardiac surgery and the Stöckert 3T HCU water samples.

A more in-depth analysis using WGS was also performed. The HCU isolates from the institution where the patient had received cardiac surgery were not available. Instead, based on the high clonality described for isolates from Stöckert 3T HCU isolates worldwide [9,12], one of the HCU isolates from the study institution was included as a reference. The reference strain was ZUERICH-1, which represents the group of strains

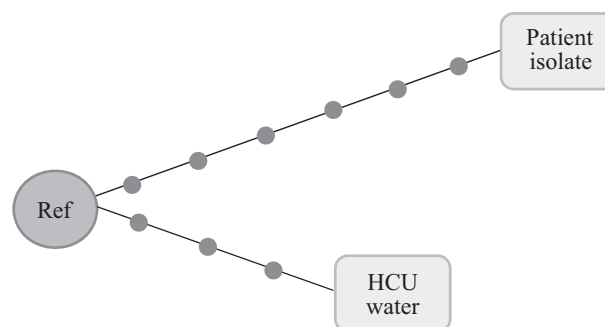


Figure 1. Network of relationships based on whole-genome sequencing data. Each black dot corresponds to a single nucleotide polymorphism. The reference strain is ZUERICH-1. HCU, heater-cooler unit.

(Group 1) that were clonally related in the global outbreak [9]. A short genetic distance was identified between the clinical and water isolates and the reference (six and three SNPs, respectively), suggesting that they are clonally related to the strain responsible for the global outbreak (Figure 1).

In order to perform a more refined assignation, the WGS data were compared with sequence data obtained from published studies. An integrative analysis of the data for 373 isolates confirmed that the study isolates can be classified into Subgroup 1.1, which includes almost all of the cases with an infection due to exposure to HCUs (Figure 2). The HCU isolate (Isolate A) in this study shared high similarity with other published 1.1 isolates, mostly taken from Stöckert 3T HCUs, from seven different countries, whereas the clinical isolate (Isolate B) from this study clustered with a group of 1.1 isolates, mostly from patients exposed to HCUs, from three different countries, including the ZUERICH-1 strain.

To the authors’ knowledge, this study reports the first Spanish case of disseminated *M. chimaera* infection after major cardiac surgery in which it is demonstrated, by means of an exhaustive comparison with all the WGS data from *M. chimaera* isolates published worldwide, the involvement of the strain (subgroup 1.1) reported to be contaminating LivaNova HCUs globally. The data also indicate that, like all the countries already reported, Spain and Spanish Stöckert 3T HCUs are also involved in the outbreak. Finally, the findings illustrate the likely existence of a burden of non-identified *M. chimaera* infections related to cardiac surgery [5].

Three challenging features resulted in *M. chimaera* going unnoticed: a 12-month latency period since exposure, non-specific symptoms, and preliminary identification of the isolate to MAC level. Additionally, establishing the link with previous surgery was hampered by the fact that it was performed in a different institution, namely, a private hospital not

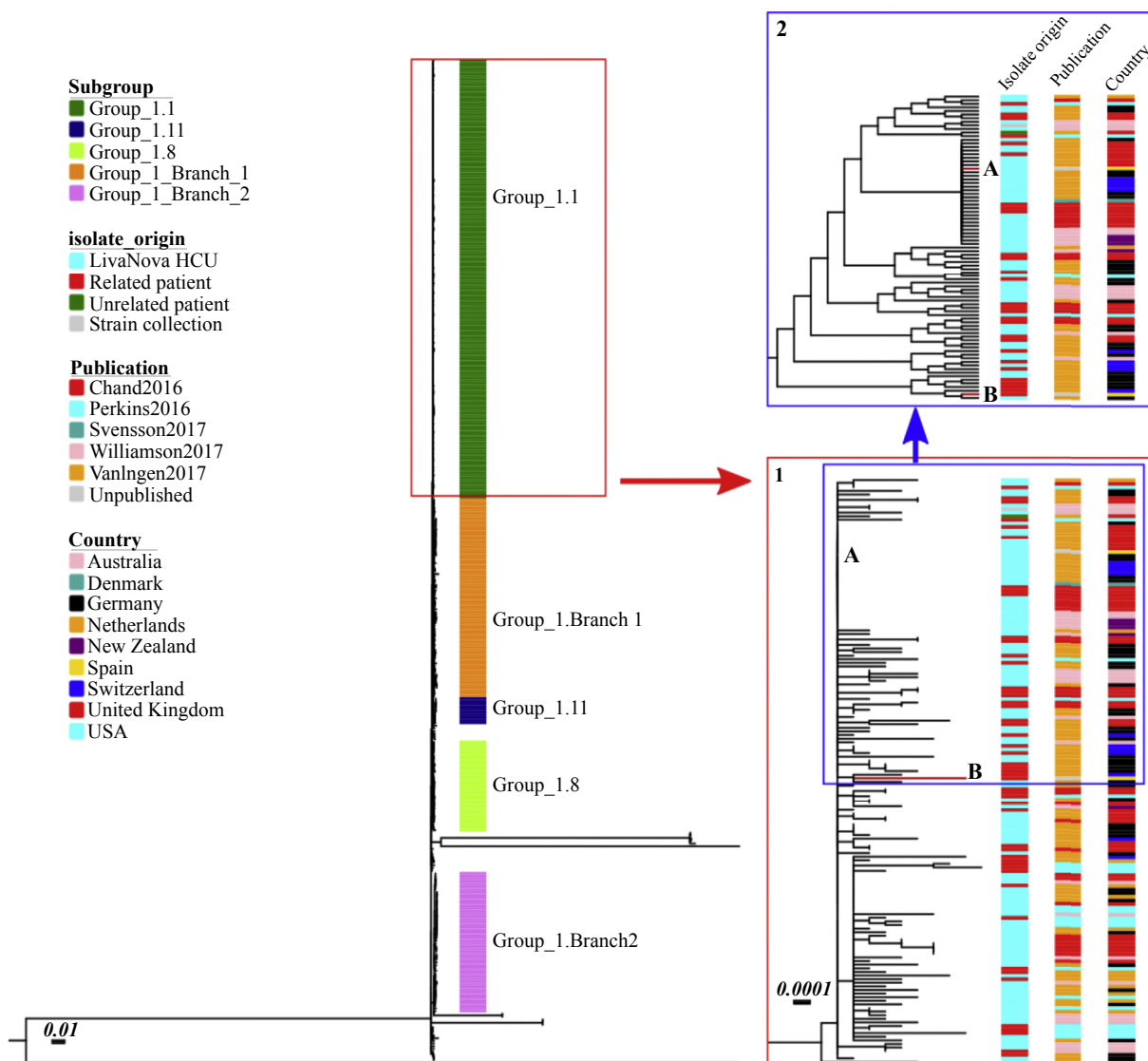


Figure 2. Maximum likelihood tree built from 11,822 single nucleotide polymorphism positions of 373 group 1 isolates mapped to the genome of *Mycobacterium chimaera* DSM-44623 (NZ_CP015278.1) shown as a rectangular phylogram with the inferred subgroups indicated. The isolates discussed in this paper are indicated in zoomed views (1 and 2), i.e. environmental heater–cooler unit (HCU) isolate (Isolate A) and clinical isolate (Isolate B). (1) Subgroup 1.1 also annotated with isolate origin, source publication and respective country. (2) Subtree containing the environmental HCU isolate (Isolate A) and clinical isolate (Isolate B), depicted as cladogram.

included in the Spanish national health system. Consequently, the authors did not have access to patient charts. The strategy of retrospectively tracking potentially undetected *M. chimaera* infections on MAC isolates and valve specimens can be extended to other institutions globally to provide more real-world figures, to optimize diagnostic approaches to help understand the true magnitude of this emerging threat.

Acknowledgements

The authors wish to thank Thomas O'Boyle for proofreading the manuscript, and Marta Tato, Microbiology Department, Ramón y Cajal Hospital, for sharing details from the environmental cultures performed at her laboratory.

Conflict of interest statement

None declared.

Funding sources

This project was funded by ISCIII (FIS15/01554). LPL holds a Miguel Servet grant (CP15/00075). FA holds a grant from IFARHU-SENACYT (270-2016-293). The work was partially funded by the German Centre for Infection Research.

References

- [1] Tortoli E, Rindi L, Garcia MJ, Chiaradonna P, Dei R, Garzelli C, et al. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:1277–85.
- [2] Achermann Y, Rossle M, Hoffmann M, Deggim V, Kuster S, Zimmermann DR, et al. Prosthetic valve endocarditis and bloodstream infection due to *Mycobacterium chimaera*. *J Clin Microbiol* 2013;51:1769–73.
- [3] Sax H, Bloemberg G, Hasse B, Sommerstein R, Kohler P, Achermann Y, et al. Prolonged outbreak of *Mycobacterium chimaera* infection after open-chest heart surgery. *Clin Infect Dis* 2015;61:67–75.
- [4] Kohler P, Kuster SP, Bloemberg G, Schulthess B, Frank M, Tanner FC, et al. Healthcare-associated prosthetic heart valve, aortic vascular graft, and disseminated *Mycobacterium chimaera* infections subsequent to open heart surgery. *Eur Heart J* 2015;36:2745–53.
- [5] Sommerstein R, Hasse B, Marschall J, Sax H, Genoni M, Schlegel M, et al. Global health estimate of invasive *Mycobacterium chimaera* infections associated with heater-cooler devices in cardiac surgery. *Emerg Infect Dis* 2018;24:576–8.
- [6] Lecorche E, Haenn S, Mougari F, Kumanski S, Veziris N, Benmansour H, et al. Comparison of methods available for identification of *Mycobacterium chimaera*. *Clin Microbiol Infect* 2018;24:409–13.
- [7] Marin M, Munoz P, Sanchez M, del Rosal M, Alcalá L, Rodriguez-Creixems M, et al. Molecular diagnosis of infective endocarditis by real-time broad-range polymerase chain reaction (PCR) and sequencing directly from heart valve tissue. *Medicine (Baltimore)* 2007;86:195–202.
- [8] Zozaya-Valdes E, Porter JL, Coventry J, Fyfe JAM, Carter GP, Goncalves da Silva A, et al. Target-specific assay for rapid and quantitative detection of *Mycobacterium chimaera* DNA. *J Clin Microbiol* 2017;55:1847–56.
- [9] van Ingen J, Kohl TA, Kranzer K, Hasse B, Keller PM, Katarzynska S, et al. Global outbreak of severe *Mycobacterium chimaera* disease after cardiac surgery: a molecular epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2017;17:1033–41.
- [10] Chand M, Lamagni T, Kranzer K, Hedge J, Moore G, Parks S, et al. Insidious risk of severe *Mycobacterium chimaera* infection in cardiac surgery patients. *Clin Infect Dis* 2017;64:335–42.
- [11] Perkins KM, Lawsin A, Hasan NA, Strong M, Halpin AL, Rodger RR, et al. Notes from the field: *Mycobacterium chimaera* contamination of heater-cooler devices used in cardiac surgery — United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2016;65:1117–8.
- [12] Svensson E, Jensen ET, Rasmussen EM, Folkvardsen DB, Norman A, Lillebaek T. *Mycobacterium chimaera* in heater-cooler units in Denmark related to isolates from the United States and United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 2017;23:507–9.
- [13] Williamson D, Howden B, Stinear T. *Mycobacterium chimaera* spread from heating and cooling units in heart surgery. *N Engl J Med* 2017;376:600–2.
- [14] Mac Aogain M, Roycroft E, Raftery P, Mok S, Fitzgibbon M, Rogers TR. Draft genome sequences of three *Mycobacterium chimaera* respiratory isolates. *Genome Announc* 2015;3:e01409–15.



Original Contribution

In-Depth Study of a Nosocomial Outbreak Caused by Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Using Whole Genome Sequencing Coupled With a Polymerase Chain Reaction Targeting Strain-Specific Single Nucleotide Polymorphisms

Fermín Acosta, Ana Fernández-Cruz, Sandra R. Maus, Pedro J. Sola-Campoy, Mercedes Marín, Emilia Cercenado, Olalla Sierra, Patricia Muñoz, Darío García de Viedma*, and Laura Pérez-Lago

* Correspondence to Dr. Darío García de Viedma, Servicio de Microbiología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Calle Doctor Esquerdo 46, Madrid 28007, Spain (e-mail: dgvedma2@gmail.com).

Initially submitted March 11, 2019; accepted for publication February 21, 2020.

In 2013–2014, an outbreak involving 14 patients infected by an extensively drug-resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* was detected in a hospital in Madrid, Spain. Our objective was to evaluate an alternative strategy for investigating the outbreak in depth by means of molecular and genomic approaches. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was applied as a first-line approach, followed by a more refined whole genome sequencing analysis. Single nucleotide polymorphisms identified by whole genome sequencing were used to design a specific polymerase chain reaction (PCR) for screening unsuspected cases infected by the outbreak strain. Whole genome sequencing alerted us to the existence of greater genetic diversity than was initially assumed, splitting the PFGE-associated outbreak isolates into 4 groups, 2 of which represented coincidental transmission unrelated to the outbreak. A multiplex allele-specific PCR targeting outbreak-specific single nucleotide polymorphisms was applied to 290 isolates, which allowed us to identify 25 additional cases related to the outbreak during 2011–2017. Whole genome sequencing coupled with an outbreak-strain-specific PCR enabled us to markedly redefine the initial picture of the outbreak by 1) ruling out initially suspected cases, 2) defining likely independent coincidental transmission events, 3) predating the starting point of the outbreak, 4) capturing new unsuspected cases, and 5) revealing that the outbreak was still active.

drug resistance; genomics; infection; nosocomial outbreaks; polymerase chain reaction; *Pseudomonas aeruginosa*

Abbreviations: ASO, allele-specific oligonucleotide; ATCC, American Type Culture Collection; MDR, multiple-drug-resistant; MLST, multilocus sequence typing; PCR, polymerase chain reaction; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; SNP, single nucleotide polymorphism; ST, sequence type; WGS, whole genome sequencing; XDR, extensively drug resistant.

Nosocomial infection is one of the greatest health concerns and represents an ongoing risk for hospitalized patients. The incorporation of molecular typing methods has extended our understanding of the source and transmission of pathogens and improved our ability to control and prevent nosocomial outbreaks (1, 2). However, the structure of the clonal population of many pathogens makes it difficult to differentiate between clones causing outbreaks, and conventional genotyping methods (e.g., pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)), multilocus sequence typing

(MLST), ribotyping) may not have sufficient discriminative power (2).

In recent years, high-throughput whole genome sequencing (WGS) has been applied to analysis of infectious disease outbreaks (1, 2). The high accuracy and discriminative ability of WGS make it a more powerful tool for the study of infectious disease transmission than the conventional genotyping methods.

Numerous studies have shown WGS to be successful for optimizing the management of nosocomial infections caused

by different pathogens (3–13). Despite these advances, the routine application of WGS is not a realistic option for most hospitals, mainly owing to the lack of infrastructure and qualified personnel. It is necessary to have tools that maintain the accuracy and discriminative power of WGS but are more affordable and easier to use and interpret. One option is allele-specific oligonucleotide (ASO) polymerase chain reaction (PCR), tailored to be strain-specific based on the data obtained from the WGS, which is a strategy that has been used successfully to survey the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* strains (14–17).

Pseudomonas aeruginosa is a major cause of nosocomial infection and is one of the most relevant pathogens causing opportunistic infections in humans. The incidence of multiple-drug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) *P. aeruginosa* infections is increasing and compromises the selection of appropriate antimicrobial therapy (18). Therefore, adequate identification of *P. aeruginosa* outbreaks is necessary for immediate intervention and control, particularly in infections caused by MDR strains.

In this study, we used WGS to analyze an outbreak of an XDR strain of *P. aeruginosa*. We used the data obtained from WGS to design an ASO PCR to assess the extent of the outbreak and the current presence of the strain responsible for the outbreak.

METHODS

The *P. aeruginosa* isolates used in this study were selected from a systematic collection of stored isolates obtained from blood and/or showing an MDR phenotype. We analyzed MDR/XDR *P. aeruginosa* strains (according to Magiorakos et al. (19)) isolated in clinical samples from the hematology department of a 1,550-bed tertiary-care teaching hospital in Madrid, Spain.

Drug susceptibility testing

Susceptibility testing was performed by means of the microdilution automated method MicroScan (Beckman Coulter, Inc., Sacramento, California) using Neg MIC Panel Type 44, following the manufacturer's recommendations (see Web Table 1, available at <https://academic.oup.com/aje>). Minimum inhibitory concentration breakpoints were determined following the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) criteria (20). *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Virginia) were used as controls.

DNA extraction

The *P. aeruginosa* strains were subcultured on Columbia agar + 5% sheep blood plates (bioMérieux SA, Marcy l'Étoile, France) and incubated at 37°C overnight. DNA was extracted using the QIAamp DNA Mini Kit protocol (Qiagen NV, Courtaboeuf, France) and eluted in 35 µL of Buffer AE (Qiagen).

Pulsed-field gel electrophoresis

PFGE was conducted as described elsewhere (21). Patterns were compared using Bionumerics software, version 5.0 (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgium). *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 was used as a control.

Whole genome sequencing

Library preparation protocols based on the recommendations for the Nextera XT Library Prep Kit (Illumina, Inc., San Diego, California) were followed, and analyses of the DNA fragments were carried out in an Illumina HiSeq 2500 device (Illumina, Inc.). Paired-end reads were obtained with an average per-base coverage of 70×. FASTQ files for the 38 isolates were deposited in the European Nucleotide Archive (<http://www.ebi.ac.uk>; accession number PRJEB29411).

Multilocus sequence typing

The MLST types of the strains were obtained uploading the FASTQ sequences to the online tool MLST 2.0 (Center for Genomic Epidemiology, Lyngby, Denmark) (22).

Bioinformatics analysis

Reads of each strain were mapped against the *P. aeruginosa* reference PAO1 genome (NC_002516.2). The sequences were analyzed with the Snippy tool, version 3.1 (23), which uses the Burrows-Wheeler Aligner (24) as the read mapper and FreeBayes (25) for the variant call step. The requirements to consider a change as a variant were a minimum base quality of 20, a minimum reading coverage of 10×, and the presence of the variant in at least 90% of the readings. For the comparative analysis, only SNPs were taken into account. We used Network 4.6.1.6 software (Fluxus Technology Ltd., Colchester, United Kingdom (www.fluxus-engineering.com)) to construct median-joining networks and the SnpEff program to annotate the SNPs found (26) (Web Table 2). The resistome profile was obtained with the srst2 program (27) (Web Table 3), and the program Gubbins (28) was used to analyze recombination events, which were removed to ensure that only vertically inherited variants were considered.

Design and development of the multiplex ASO PCR

We designed a multiplex ASO PCR to identify the strain of *P. aeruginosa* responsible for the outbreak, targeting 5 specific SNPs (Table 1). Target alleles and the sizes of the PCR products were selected and designed to obtain 2 alternative (outbreak/nonoutbreak) patterns (Table 1). The conditions of the assay were as follows: 2.6 mM magnesium chloride, 1% dimethyl sulfoxide, and 0.8 µM PA5051 and PA2004 primers; 0.4 µM PA4857, PA0533, and PA3250 primers; 200 µM deoxyribonucleotide triphosphates; and 0.4 µL of AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, California). Primers are described in Table 1. PCR

Table 1. Primers, Allele Targets, and Polymerase Chain Reaction Product Sizes Used to Design a Multiplex Allele-Specific Oligonucleotide Polymerase Chain Reaction for the Study of a Nosocomial Outbreak of Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*, Madrid, Spain, 2010–2017

Primer ID No.	SNP Analyzed	Forward Sequence	Reverse Sequence	Allele Target	PCR Product Size, base pairs
PA5051	5690878 G/A	5'-GCAATCCGCTCCCGGT A -3'	5'-ACAGGTCGGCGTACTTCAC-3'	Outbreak strain	438
PA4857	5455614 A/C	5'-CCTGTTCCGGCCGCTACC C -3'	5'-CTGACGATCTGTAGTCCCTGG-3'	Outbreak strain	348
PA0533	591856 G/A	5'-GACGCCACCGAGTGG G -3'	5'-ACTTGCCTCCGCCCTC-3'	Nonoutbreak strain	289
PA3250	3636704 G/A	5'-CCGAAGCGGACCTGCA A -3'	5'-CGTTGTCCTTCTCGGCCT-3'	Outbreak strain	195
PA2004	2190930 G/C	5'-GGTGATCACCTCCTGGC-3'	5'-AGAACAGCCCGATGACGA G -3'	Nonoutbreak strain	113

Abbreviations: A, adenine; C, cytosine; G, guanine; ID, identification; PCR, polymerase chain reaction; SNP, single nucleotide polymorphism; T, thymine.

conditions were as follows: 95°C for 15 minutes, followed by 30 cycles at 95°C for 1 minute, 59°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute, and a final step at 72°C for 10 minutes.

Ethics

This study was performed on microbiological stored samples, not human products, and no patient data were handled. All of the conditions for waiving informed consent were met.

RESULTS

Initial description of the outbreak

Between October 2013 and December 2014, an unusual increase in the number of patients with bacteremia caused by MDR *P. aeruginosa* was detected in the hematology ward of a teaching hospital in Madrid, Spain, with a catchment population of 650,000–750,000 inhabitants. The hematology department consists of a bone marrow transplantation unit with 8 beds and a hematological ward with 11 beds. Fourteen cases were diagnosed during this period, with no cases diagnosed in the previous 8 months (Web Figure 1). This increase was not detected in the global figures for the whole institution but was restricted to the hematology ward, which triggered the alarm for an outbreak.

The first analytical approach was based on PFGE. We included 11 available isolates for the 14 outbreak patients and 5 isolates from the same ward obtained before the epidemiologically defined outbreak in 2012 with a similar susceptibility pattern. For 1 of the outbreak cases, we included 2 isolates (isolates 139 and 143) as a reproducibility control. Finally, we included 6 unrelated isolates—that is, non-MDR *P. aeruginosa* clinical isolates from the same period (2011–2013) and a duplicated ATCC 27853 reference strain.

The isolates for 15 patients had an identical/highly similar PFGE pattern (P1; Figure 1). The reproducibility controls had identical patterns. The P1 pattern was obtained from all of the outbreak isolates and 4 of the 5 additional isolates from the hematology ward obtained in 2012. Eight subgroups (P1 A–H) were defined within the P1 group. Seven

additional patterns, other than P1 (P2–P8), were observed in the remaining isolates. All unrelated controls and 1 of the 5 MDR isolates from 2012 (isolate 7488) clustered separately from the P1 group (Figure 1). These data confirmed the clonality of the outbreak and revealed that 4 cases from 2012 (isolates 2,184, 1,031, 140, and 151), which were not initially suspected, were also part of the outbreak.

WGS-based analysis of the outbreak

We performed a more refined WGS analysis on the 16 outbreak-related P1 isolates (Figure 1). For the reproducibility control, we added a third isolate (isolate 138) from the same patient (isolates 139 and 143). Finally, we included 5 representatives (isolates 130, 131, 132, 152, and 7488) of the nonrelated isolates included in the PFGE assay (Figure 1).

The WGS data split the PFGE-associated outbreak isolates into 3 branches and 1 node (Figure 2). One branch corresponded to a main group (group 1), including 9 of the 15 cases considered outbreak-related by PFGE. This group differed from the others in 27 SNPs (isolate 140), 51/52 SNPs (isolates 148 and 147), and 124–128 SNPs (isolates 129, 149, and 150), respectively (Figure 2). All of the isolates in group 1 shared 19 SNPs, which were exclusive for these isolates. The pairwise distances between neighboring isolates in group 1 were ≤ 11 SNPs, and the maximum diversity for any 2 isolates within the group was 16 SNPs. Group 1 included the isolates from pulsotypes P1A, P1B, P1D, and P1F (Figure 2).

As for the other 2 minority branches revealed in the WGS network (Figure 2), group 2 included the 2 isolates corresponding to pulsotype P1C (isolates 147 and 148; pairwise distances, 2–3 SNPs), whereas group 3 included 3 isolates corresponding to pulsotypes P1H and P1G (isolates 129, 149, and 150; pairwise distance, 1–5 SNPs). Finally, the node corresponded to isolate 140 (P1E).

The 5 unrelated isolates accumulated more than 5,000 SNPs with respect to those in any of these 4 groups. MLST types were assigned from the WGS data, and the results were consistent with this general distribution of diversity based on WGS data, as the unrelated controls corresponded to sequence types STs—ST130 (ST-253), 132 (ST-381), 131



Figure 1. Results of pulsed-field gel electrophoresis for suspected *Pseudomonas aeruginosa* outbreak isolates in a Madrid, Spain, hospital, and results for the same ward and the same resistance profile from 2012 (“Related”) and unrelated (“Unrelated”) controls, 2010–2017. The phylogenetic relationship between the study cases is represented on the left. ATCC, American Type Culture Collection; MDR, multiple-drug-resistant; XDR, extensively drug resistant.

(ST-557), and 152 (ST-277)—that were different from the sequence types of the isolates included in the network, all sharing ST-175.

The WGS-based network alerted us to higher diversity than was initially assumed for the isolates. Six of the 15 cases initially considered to be part of the outbreak were now split, showing short SNP-based distances between 3 and 2 of them, which suggested potential additional links between them.

The topology of the SNP-based network indicated that isolate 1031 (year 2012) was allocated to the node corresponding to the likely index case of the outbreak (Figure 2), indicating that the outbreak started before the outbreak defined by epidemiologic criteria (October 2013).

Tailored strategy for further refining the analysis of the outbreak

Design and application of an outbreak-strain-specific PCR. The WGS analysis revealed 19 exclusive SNPs which were shared by all of the outbreak isolates and which were absent from all of the nonrelated isolates (Figure 2).

We designed a multiplex ASO PCR to target 5 of the 19 strain-specific SNPs in the same reaction. We confirmed

their outbreak specificity because these 5 SNPs were not described in 100 *P. aeruginosa* sequences from studies/projects deposited in the *Pseudomonas* Genome Database (<http://www.pseudomonas.com>) (29). The length of the 5 possible amplicons in this multiplex ASO PCR was calculated to lead to 2 alternative patterns depending on whether or not the analyzed strain corresponded to the outbreak strain (Figure 3A and Table 1).

Appropriate performance of the ASO PCR was tested on all of the 20 *P. aeruginosa* strains analyzed by WGS. All 20 yielded the expected outbreak or nonoutbreak patterns. Analysis of 11 additional unrelated strains revealed the amplification pattern corresponding to nonoutbreak strains. We recovered 3 isolates from the cases that were initially epidemiologically linked with the outbreak but were not available for PFGE analysis (isolates ID-33 (2013), 137, and 5321 (2014)); the outbreak-specific PCR ruled out the involvement of the 2013 isolate and confirmed that the 2 cases from 2014 should also be included.

Extensive application of the outbreak-strain-specific PCR. The WGS analysis assigned a starting point of the outbreak that predated the one initially considered, suggesting that a more thorough definition of the true magnitude of the

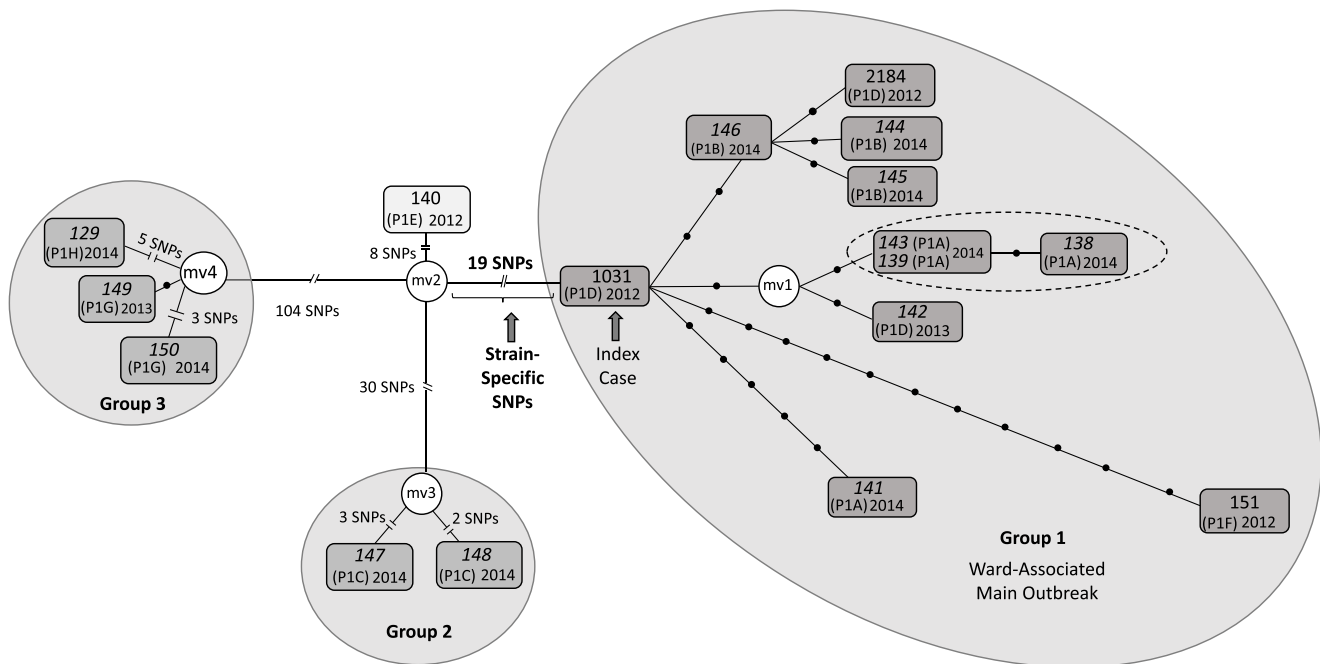


Figure 2. Network of the phylogenetic distribution of the closest *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from whole genome sequencing data in the first selection of samples from a Madrid, Spain, hospital, 2010–2017. Each black dot corresponds to a single nucleotide polymorphism (SNP). Isolates within the dashed oval were from the same patient. Strain-specific SNPs are shown in boldface type. Numbers shown in italic type correspond to the isolates initially associated with the outbreak. mv, median vector.

outbreak was required. We selected an extensive sample of MDR *P. aeruginosa* isolates looking beyond the strains from the hematology ward and/or the time initially suspected to cover the outbreak.

From our collection, we selected all of the isolates (1 per patient) that had been registered as corresponding to 1) patients in the hematology ward, 2) bone marrow transplant recipients, and 3) MDR strains from any department. Sampling was performed between 2010 and 2017, with 30 isolates/year guaranteed. Whenever this number was not reached, we added *P. aeruginosa* isolates from blood (Web Figure 2).

Based on the availability of the outbreak-strain-specific PCR, we performed a fast, high-throughput analysis of 240 isolates and obtained an interpretable PCR result for 209 (87%; Figure 3B and Table 2). The pattern expected for the outbreak strain was found in a further 25 cases (12% of the cases with a PCR result) (Table 2). In addition to the years when the outbreak was determined (2013–2014), we detected the outbreak strain in every remaining year for the period 2011–2017, indicating that the event was more prolonged than initially suspected and that it was still active. The frequency for the strain rose slightly over the years until 2017, when there was a marked increase (around half of the isolates). No outbreak strains were detected in the first year of our analysis period (2010). To determine more firmly whether the outbreak did in fact start in 2011, we analyzed all 80 *P. aeruginosa* isolates available in our collection for 2010. All 80 led to the nonoutbreak pattern, thus increasing the likelihood that 2011 was the starting point for the outbreak.

New updated WGS-based snapshot of the outbreak. We performed WGS on a selection of the newly PCR-captured outbreak isolates (8 isolates) or nonoutbreak isolates (6 isolates) to 1) confirm proper assignment by strain-specific PCR and 2) allocate the new isolates in the outbreak network. We also included the 2 isolates from 2014, which were not included in the initial PFGE analysis but were later considered to be part of the outbreak on the basis of strain-specific PCR data.

WGS data confirmed proper assignment based on the strain-specific PCR (Figure 4A). All of the isolates labeled “outbreak strain” accumulated ≤ 8 SNPs with respect to the index case of outbreak group 1. The picture of the outbreak was completed either with new subbranches within group 1 or by adding previously defined ones (Figure 4A).

Five of the 6 sequenced isolates labeled as “nonoutbreak strain” by ASO PCR accumulated more than 5,000 SNPs with respect to the outbreak index strain (isolate 1031), and the sixth isolate (isolate 16539) showed a difference of 128 SNPs, which confirmed that these were not part of the outbreak. Coincidentally, isolate 16539 fed the group 3 branch in the tree. It corresponded to one of the 2 more limited transmission events revealed in the first WGS analysis (group 3; Figure 4B).

It is noteworthy that this update of the WGS-based network showed that the node corresponding to the index case—a 2012 isolate—is now shared by one of the new outbreak-related isolates captured by the outbreak-specific PCR. The node is now also occupied by a 2011 isolate (isolate 3478), predating once again the starting point of the

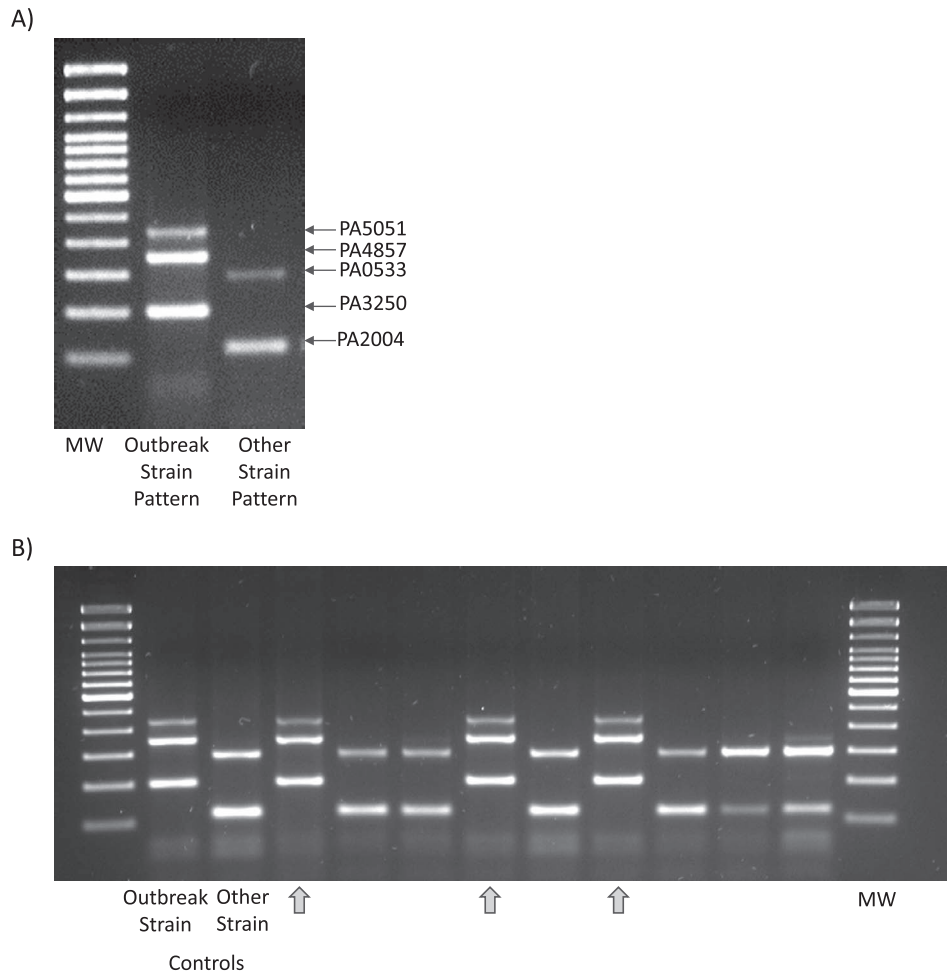


Figure 3. A) Control patterns obtained from application of an allele-specific oligonucleotide (ASO) polymerase chain reaction (PCR) to *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a Madrid, Spain, hospital, 2010–2017. B) ASO PCR results obtained when the ASO PCR was applied to a selection of tracking samples. Arrows indicate the isolates with the outbreak strain pattern. MW, molecular weight (100–base-pair ladder).

outbreak (Figure 4A). This new chronology can be considered definitive, since, after exhaustive sampling, no outbreak isolates were identified for 2010.

DISCUSSION

Nosocomial transmission of infection is a major challenge for health-care institutions. Efficient control mechanisms

Table 2. Results From Extensive Application of a Specific Polymerase Chain Reaction to the Study of a Nosocomial Outbreak of Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*, Madrid, Spain, 2010–2017

No. of Isolates	Year								Total
	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	
Total	30	30	30	30	30	30	30	30	240
Outbreak strains	0	1	1	1	0	3	3	16	25
Nonoutbreak strains	28	24	23	26	26	21	25	11	184
No result	2	5	6	3	4	6	2	3	31

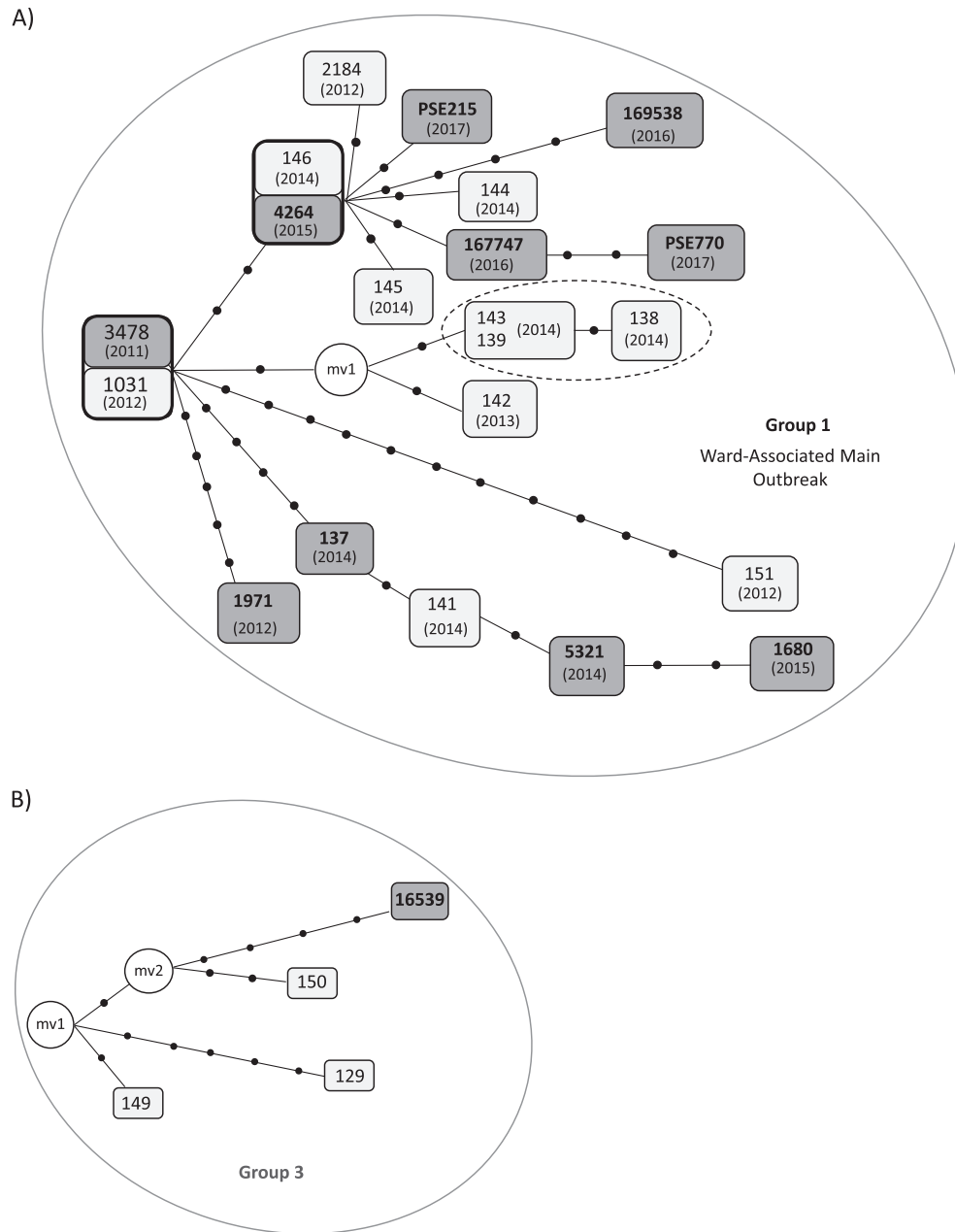


Figure 4. A) Phylogenetic distribution network of a *Pseudomonas aeruginosa* outbreak strain based on whole genome sequencing data in all sequenced samples involved in the main outbreak, Madrid, Spain, 2010–2017. B) Phylogenetic distribution network of isolates involved in the secondary outbreak. Isolates identified by means of allele-specific oligonucleotide polymerase chain reaction are represented as dark boxes, and isolates from the first group of isolates selected are shown in light boxes. Isolates within the dashed oval were from the same patient. Each black dot corresponds to a single nucleotide polymorphism. mv, median vector.

can only be implemented once the true magnitude of the problem has been established in chronological and geographical terms. In this study, we demonstrated how the analysis of an outbreak by WGS combined with the extensive application of an outbreak-strain-specific PCR markedly transformed the initial description of the outbreak.

The most common genotypic approaches applied to characterize outbreaks involving *P. aeruginosa* are MLST,

variable number of tandem repeats, and PFGE. MLST is simpler but less discriminative than PFGE. However, when we applied WGS, even the information provided by PFGE was insufficient to precisely characterize the outbreak. PFGE assigned identical or highly similar patterns not only for the isolates grouped in the main outbreak branch in the WGS-based network but also for other nonrelated isolates, which were split by WGS into different branches.

The higher accuracy of WGS for characterizing *P. aeruginosa* outbreaks compared with variable number of tandem repeats/PFGE has been demonstrated elsewhere (10). However, the number of studies based on WGS for tracking nosocomial transmission of *P. aeruginosa* is still limited (9–12, 30). Moreover, systematic studies are necessary to establish the SNP-based thresholds for determining whether *P. aeruginosa* isolates are linked or unrelated, as is the case for other pathogens (31). Our reference was the estimated mutation rate for *P. aeruginosa* (around 1 SNP every 3–4 months) (9). According to this rate, the maximum genetic distance over the 3 years of the first outbreak period (2012–2014) would be 24 SNPs (Figure 2). If we establish this value as a reference, all but 1 of the isolates were clearly distributed above or below the value. The remaining case (isolate 140, year 2012) showed 27 SNPs with the isolate considered to be the index case (isolate 1031). We ruled out the association between isolate 140 and the outbreak on the basis of a major observation—namely, it did not share the exclusive 19 SNPs that were shared by all of the outbreak isolates. Additionally, the genetic distance between the outbreak strains that were more distant in time (2011–2017) was 3–5 SNPs, while isolate 140 accumulated 38 SNPs with the outbreak isolates for the same year (2012). In addition, the maximum pairwise distance between any outbreak isolates was 19 SNPs.

Since WGS is the most accurate method of surveying outbreaks, it would be necessary to carry out systematic WGS in an outbreak. Such an approach is too expensive for the average hospital, and even when possible, response times could still be far from those needed to control ongoing outbreaks. We propose a simpler alternative strategy which reduces the number of cases in which WGS is required. Our strategy is based on tailoring PCRs to specifically survey the strain responsible for the outbreak by taking advantage of the discriminatory power of WGS to identify the specific SNPs of the outbreak strain. This strategy has already been successfully tested by our research group for the specific identification of strains of *M. tuberculosis* in various contexts (14–17). Our outbreak-specific PCR enabled us to perform a high-throughput analysis of another 290 isolates, looking beyond the chronological and geographical boundaries we had analyzed until then. We captured 25 cases that had not previously been suspected of being part of the outbreak.

The new extended picture of the outbreak enabled us to make a series of relevant observations. First, the outbreak was currently active; in fact, a high increase in the number of outbreak-related cases was recorded in 2017. We cannot fully rule out the possibility that the strain may have been reintroduced into the institution at different time points during the study period. However, the high genetic proximity between the involved isolates, the 19 shared strain-specific SNPs, and the fact that the outbreak was restricted to a single ward increases the likelihood of a single persistent localized event. Second, the chronological start of the outbreak could be precisely determined. An added value of WGS-based networks is that by studying their topology we can identify the likely index case. The complete analysis by WGS allowed us to relocate the index case twice.

Some nonrelated isolates (identified by the specific PCR) were analyzed by WGS to confirm proper assignment of nonoutbreak strains by the PCR. Coincidentally, one of these nonrelated strains was closely related to one of the previously unsuspected smaller overlapping outbreaks, as revealed by WGS. This event, which was not distinguishable on the basis of epidemiologic or PFGE criteria, would probably benefit from parallel surveillance with another tailored strain-specific PCR.

There are some points worth noting regarding the steps taken to control MDR *P. aeruginosa* in the hospital during the study period. The outbreak was not initially recognized because drug-resistant *P. aeruginosa* is relatively common among oncohematological patients. A severe infection occurred once a month, and the unusual number of infections did not stand out until 1 patient died. Thus, bloodstream infections from preceding months were reviewed, the strains were genotyped, and several infection control measures were initiated. For example, cleaning was intensified, staffing in the unit was increased, and visitation was restricted (including the placement of a control door), as well as implementation of hand hygiene compliance, environmental sampling, and water engineering revision. After outbreak identification, surveillance of rectal colonization at admission was established and colonized patients were managed with contact precautions. The outbreak was controlled, although the source was not identified.

The strategy we propose for the investigation of nosocomial outbreaks of *P. aeruginosa* is an alternative to standard approaches. Substantial expertise is needed for this, in addition to investment in equipment. However, it is adapted to an application format, based on targeted PCR, which is easier and cheaper than systematic WGS. The whole process may be performed in approximately 1 month, as shown by our research group elsewhere (17). The strategy, once implemented, could facilitate retrospective update of isolate collections; in addition, its systematic use would help control new transmission events and monitor the success of the intervention.

In conclusion, the application of WGS to isolates suspected of being part of an XDR *P. aeruginosa* nosocomial outbreak enabled us to redefine the outbreak with greater accuracy and to design a specific PCR for optimizing the surveillance of the outbreak strain. The integrative analysis of the outbreak strain, together with the information provided by WGS, allowed us to rule out cases that had been misassigned as related and to capture new, previously unsuspected cases. It also revealed that the outbreak extended further than initially suspected, facilitated accurate identification of the index case, alerted us to the current activity of the outbreak, and revealed 2 smaller transmission events overlapping with the main outbreak.

ACKNOWLEDGMENTS

Author affiliations: Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain (Fermín Acosta, Ana

Fernández-Cruz, Sandra R. Maus, Pedro J. Sola-Campoy, Mercedes Marín, Emilia Cercenado, Olalla Sierra, Patricia Muñoz, Darío García de Viedma, and Laura Pérez-Lago); Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain (Fermín Acosta, Ana Fernández-Cruz, Sandra R. Maus, Pedro J. Sola-Campoy, Mercedes Marín, Emilia Cercenado, Olalla Sierra, Patricia Muñoz, Darío García de Viedma, and Laura Pérez-Lago); Centro de Investigación en Red Enfermedades Respiratorias, Madrid, Spain (Mercedes Marín, Emilia Cercenado, Patricia Muñoz, and Darío García de Viedma); and Department of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain (Emilia Cercenado, and Patricia Muñoz).

This work was funded by the Instituto de Salud Carlos III (Miguel Servet grants CP15/00075 and MS15/00075 for L.P.-L. and grants PI16/01449 (L.P.-L.) and PI18/00599 (D.G.V.); the Instituto para la Formación y Aprovechamiento de Recursos Humanos–Secretaría Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación (grant 270-2016-293 to F.A.); and the European Regional Development Fund (funds from the European Commission (“A Way of Making Europe”).

We thank Thomas O’Boyle and Dainora Jaloveckas for proofreading the manuscript.

Conflict of interest: none declared.

REFERENCES

- Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill.* 2013;18(4): 20380.
- Le VT, Diep BA. Selected insights from application of whole-genome sequencing for outbreak investigations. *Curr Opin Crit Care.* 2013;19(5):432–439.
- Quainoo S, Coolen JPM, van Hijum S, et al. Whole-genome sequencing of bacterial pathogens: the future of nosocomial outbreak analysis. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(4): 1015–1063.
- Eyre DW, Cule ML, Wilson DJ, et al. Diverse sources of *C. difficile* infection identified on whole-genome sequencing. *N Engl J Med.* 2013;369(13):1195–1205.
- Harris SR, Cartwright EJ, Torok ME, et al. Whole-genome sequencing for analysis of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(2):130–136.
- Tong SY, Holden MT, Nickerson EK, et al. Genome sequencing defines phylogeny and spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a high transmission setting. *Genome Res.* 2015;25(1):111–118.
- Heinrichs A, Argudín MA, De Mendonça R, et al. An outpatient clinic as a potential site of transmission for an outbreak of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* ST716: a study using whole-genome sequencing. *Clin Infect Dis.* 2019;68(6):993–1000.
- Becker SL, Berger FK, Feldner SK, et al. Outbreak of *Burkholderia cepacia* complex infections associated with contaminated octenidine mouthwash solution, Germany, August to September 2018. *Euro Surveill.* 2018;23(42): 1800540.
- Davis RJ, Jensen SO, Van Hal S, et al. Whole genome sequencing in real-time investigation and management of a *Pseudomonas aeruginosa* outbreak on a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2015;36(9): 1058–1064.
- Parcell BJ, Oravcova K, Pinheiro M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* intensive care unit outbreak: winnowing of transmissions with molecular and genomic typing. *J Hosp Infect.* 2018;98(3):282–288.
- Quick J, Cumley N, Wearn CM, et al. Seeking the source of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a recently opened hospital: an observational study using whole-genome sequencing. *BMJ Open.* 2014;4(11): e006278.
- Snyder LA, Loman NJ, Faraj LA, et al. Epidemiological investigation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a six-year-long hospital outbreak using high-throughput whole genome sequencing. *Euro Surveill.* 2013;18(42): 20611.
- Roisin S, Gaudin C, De Mendonça R, et al. Pan-genome multilocus sequence typing and outbreak-specific reference-based single nucleotide polymorphism analysis to resolve two concurrent *Staphylococcus aureus* outbreaks in neonatal services. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(6): 520–526.
- Pérez-Lago L, Herranz M, Comas I, et al. Ultrafast assessment of the presence of a high-risk *Mycobacterium tuberculosis* strain in a population. *J Clin Microbiol.* 2016;54(3):779–781.
- Pérez-Lago L, Izco S, Herranz M, et al. A novel strategy based on genomics and specific PCR reveals how a multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain became prevalent in Equatorial Guinea 15 years after its emergence. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23(2):92–97.
- Pérez-Lago L, Martínez-Lirola M, Herranz M, et al. Fast and low-cost decentralized surveillance of transmission of tuberculosis based on strain-specific PCRs tailored from whole genome sequencing data: a pilot study. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21(3):249 e1–249 e9.
- Pérez-Lago L, Martínez-Lirola M, García S, et al. Urgent implementation in a hospital setting of a strategy to rule out secondary cases caused by imported extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains at diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2016;54(12):2969–2974.
- Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, et al. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat.* 2015;21-22:41–59.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268–281.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Clinical breakpoints and dosing of antibiotics. https://eucast.org/clinical_breakpoints/. Updated January 1, 2019. Accessed January 25, 2020.
- Sánchez-Carrillo C, Padilla B, Marín M, et al. Contaminated feeding bottles: the source of an outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control.* 2009;37(2):150–154.
- Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol.* 2012;50(4):1355–1361.
- Seemann T. Snippy: rapid haplotype variant calling and core genome alignment. <https://github.com/tseemann/snippy>. Accessed April 13, 2020.
- Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2010;26(5):589–595.

25. Garrison E, Marth G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing [abstract]. *arXiv*. 2012. [arXiv:1207.3907v2](https://arxiv.org/abs/1207.3907v2) [q-bio.GN] Accessed April 13, 2020.
26. Cingolani P, Platts A, Wang LL, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*. 2012;6(2):80–92.
27. Inouye M, Dashnow H, Raven LA, et al. SRST2: rapid genomic surveillance for public health and hospital microbiology labs. *Genome Med*. 2014;6(11): Article 90.
28. Croucher NJ, Page AJ, Connor TR, et al. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(3): e15.
29. Winsor GL, Griffiths EJ, Lo R, et al. Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* Genome Database. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D646–D653.
30. Witney AA, Gould KA, Pope CF, et al. Genome sequencing and characterization of an extensively drug-resistant sequence type 111 serotype O12 hospital outbreak strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(10): O609–O618.
31. Walker TM, Ip CL, Harrell RH, et al. Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(2):137–146.



Discusión

La discriminación genotípica entre cepas del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) ha permitido abordar de un modo más preciso la vigilancia de la transmisión de la tuberculosis (TB), dando pie a una nueva disciplina, la epidemiología molecular de la TB. Desde sus comienzos, a principios de los años 1990, apoyada en las técnicas de RFLP-IS6110 [89] y espoligotipado [74] arrojó luz en relación a las dinámicas de transmisión en diferentes poblaciones, a la caracterización de brotes en entornos cerrados, como prisiones, y abordó el estudio de eventos de transmisión de cepas resistentes [83, 271, 272].

La implementación posterior de la técnica VNTR-MIRU, desde su primera aproximación de multiplexado de 12 loci hasta las versiones más discriminativas con 24 loci [96], aceleró la obtención de resultados, cubriendo las limitaciones de los métodos antecesores. En ese momento se dio el salto a abordar estudios más ambiciosos, con base poblacional [100, 146] y se comenzaron a describir escenarios epidemiológicos complejos, como resultado de la creciente presencia de población migrante [86, 101].

La emergencia en los últimos años de las técnicas de secuenciación masiva ha supuesto una revolución en diferentes campos de la medicina y la investigación, tanto en el diagnóstico como en clínica, pero también, ha conllevado un enorme avance en el terreno de la epidemiología. En el caso de la tuberculosis, el empleo de la secuenciación de genoma completo (WGS) de cepas de MTB ha permitido conseguir niveles de resolución y discriminación en la definición de cadenas de transmisión nunca antes alcanzados, así como obtener información adicional, como establecer la direccionalidad de la transmisión, identificar el caso índice o desvelar la presencia de nodos no muestreados o no diagnosticados. La epidemiología genómica de la tuberculosis es una estrategia de análisis cada vez más generalizada en países con elevados recursos, hasta el punto de haber sido implementada como único abordaje epidemiológico en algunos países, como Dinamarca, Inglaterra, Bélgica y Estados Unidos [71, 117-119, 149, 273]. La

aplicación sistemática del análisis genómico en la epidemiología de la TB ha sido posible gracias a la definición en 2013 por Walker et al., [107] de los umbrales que deben de ser utilizados para considerar dos aislados como pertenecientes a un mismo evento de transmisión reciente (> 5 SNPs), o bien como no relacionados (>12 SNPs). Desde su definición, estos valores han sido corroborados por otros muchos estudios [113, 114, 117, 120] y han demostrado ser robustos incluso en circunstancias que podrían permitir una mayor acumulación de diversidad, como son los clusters con un número muy elevado de miembros o cuando confluyen eventos de reactivación y cadenas de transmisión activas [274].

La utilización de la epidemiología molecular y genómica permite analizar y describir en profundidad las cadenas de transmisión de TB a nivel local, pero también, abre la posibilidad de realizar estudios poblacionales para el estudio de las dinámicas de transmisión a nivel global. En el desarrollo de esta tesis, apoyados en distintas herramientas y estrategias moleculares/genómicas para el estudio de la TB ha sido posible i) desvelar la transmisión intercontinental de una cepa MDR, como resultado de los movimientos migratorios internacionales, ii) implementar una herramienta molecular sencilla de vigilancia de la transmisión de TB en un entorno, Panamá, carente de programas de epidemiología molecular sistemática y iii) analizar en profundidad la expansión extensiva de una cepa prevalente del linaje Beijing en una provincia de Panamá.

1. Transmisión intercontinental de tuberculosis MDR como consecuencia de los movimientos migratorios internacionales.

La mayor parte de los estudios de epidemiología molecular avanzada, que se dirigen a una mayor comprensión del impacto de la migración en las dinámicas de transmisión de TB se centran en el estudio de las poblaciones receptoras [86, 132], implementando las estrategias de epidemiología molecular para fortalecer los programas de control y vigilancia de la TB, persiguiendo una reducción en la tasa

de incidencia de TB. Fruto de estos estudios, se ha podido documentar que los casos de TB en migrantes, además de poder ser resultado de reactivaciones tras la llegada, habitualmente a países de baja carga de enfermedad, que en ocasiones suponen una incidencia de 10-20 veces con respecto a las tasas generales del país receptor [275], pueden ser el resultado de transmisión reciente, una vez en el país receptor [275-277]. Sin embargo, la mayor parte de estos estudios han desatendido la integración, en el mismo análisis, de los países de origen de los migrantes. Es, por tanto, que el nuevo reto que enfrentan los estudios de epidemiología molecular de TB es el de dar el salto a la vigilancia transnacional de un modo sistemático, cerrando la etapa de estudios nacionales concretos [101, 132, 144, 278]. La vigilancia transfronteriza de la transmisión de TB requiere de un marco de colaboración multinacional, que permita precisar las rutas de transmisión e identificar las cepas implicadas.

Conscientes de este nuevo desafío en el modo en el que es necesario abordar la vigilancia global de la transmisión de TB, escogimos el estudio integrado de la transmisión de TB a lo largo del eje migratorio transcontinental Latinoamérica-Europa mediterránea, como modelo de estudio de epidemiología molecular adaptado al nuevo paradigma de vigilancia. Además, nos centramos en las cepas MDR por priorizar el estudio de aquellos eventos con un mayor impacto clínico y epidemiológico.

En el nodo latinoamericano de este eje migratorio, seleccionamos el distrito de San Juan Lurigancho en Lima (Perú), una población con una prevalencia del 7% de TB-MDR [279]. La contraparte europea del mismo eje estuvo representada por Italia y España, con el fin de evaluar el impacto de la TB-MDR de origen en dos países receptores de migrantes peruanos y con baja incidencia de TB-MDR.

El análisis genotípico, mediante MIRU-VNTR, de 60 casos consecutivos de TB-MDR procedentes del distrito de San Juan de Lurigancho (2014-15), mostró un elevado número de casos involucrados en cadenas de transmisión. El porcentaje

de los casos en cluster de nuestro análisis (60%) fue considerablemente más alto que los valores obtenidos en otros estudios poblacionales (19%-46%) [101, 280, 281], incluso en aquellos focalizados en cepas pansensibles, cuya transmisión se asume más eficiente debido a que su “fitness” no se ha visto afectado por el coste de la adquisición de resistencia [120, 282].

Nuestra muestra incluyó aproximadamente el 20% del total de casos TB-MDR de Lima y el período de recolección de cepas fue más corto de lo recomendado en la literatura para la identificación eficiente de cadenas de transmisión [283], de manera que la verdadera proporción de casos resultado de transmisión reciente podría ser aún superior. Un estudio previo de Barletta *et al.*, [279] realizado en San Juan de Lurigancho en 2011, identificó un 31.4% de casos de TB-MDR en cluster. Nuestros datos elevan ese porcentaje hasta un 60%, sugiriendo un considerable aumento en la tasa de transmisión de cepas MDR en los años recientes, aunque los datos de ambos estudios no pueden compararse de forma absoluta, puesto que el estudio de Barletta *et al.*, [279] consideraba exclusivamente primeros episodios de TB. Aun teniendo en cuenta estos aspectos, la tasa de transmisión de cepas MDR en el distrito de San Juan de Lurigancho es alarmantemente elevada, probablemente resultado de la falta de programas específicos y estrategias dirigidas a la vigilancia y control de la transmisión de TB.

La comparación de los genotipos de las cepas MDR involucradas en la transmisión activa en San Juan de Lurigancho con los genotipos de colecciones de Italia (2001-2010) y España (2003-2009) permitió identificar la presencia de tres de las cepas en Europa, lo que sugiere una potencial exportación intercontinental de las mismas. Una de estas cepas (C8-LPMDR) se identificó tanto en España como en Italia, y fué responsable en Italia de un brote detectado en el año 2007 que involucró a 11 pacientes en Florencia y 2 en Milán, mayoritariamente migrantes procedentes de Perú que mostraban vínculos epidemiológicos en la ciudad de residencia. Estos datos refuerzan la hipótesis de una distribución intercontinental de

cepas MDR mediada por la migración en el eje Latinoamérica-Europa mediterránea y la subsecuente transmisión en destino causando un brote entre individuos relacionados.

La literatura recoge muy pocos estudios de epidemiología molecular centrados en el análisis de la transmisión transnacional de la TB, Fiebig *et al* [284] describieron en 2017 la distribución internacional de una cepa de TB-MDR responsable de 10 casos e identificada en tres países europeos (Rumanía, Alemania y Austria). En comparación con este estudio, nuestro evento incluyó un mayor número de casos (17 en total), cubrió un período de tiempo más prolongado (11 años) y abarcó un mayor alcance geográfico al involucrar países de diferentes continentes.

Estos trabajos alertan sobre la realidad de la transmisión transfronteriza de la TB y deben animar al desarrollo de estudios epidemiológicos con una visión global e integrada que contemple los desplazamientos y movimientos migratorios de individuos que proceden de países con elevada incidencia de tuberculosis y, especialmente, de aquellos con altas tasas de TB-MDR.

La introducción en los últimos años del lenguaje genómico en la epidemiología de la TB ha conseguido incrementar al máximo la precisión en los análisis de transmisión debido al enorme poder discriminativo que supone acceder a la información completa del genoma. En nuestro estudio, la secuenciación de genoma completo (WGS) de 12 de los 17 aislados de la cepa C8-LPMDR, confirmó la hipótesis de encontrarnos ante una transmisión transcontinental de una cepa MDR. La alta similitud genómica observada entre los aislados de los casos identificados en Europa y los casos identificados en Lima (1-3 SNPs) demostró la vinculación entre las cepas. Además, el estudio de la topología de las redes de relación de los SNPs identificados entre los aislados estudiados mostró 2 ramas separadas. Esta topología sugiere la existencia de dos eventos independientes de exportación, implicando a dos variantes de una misma cepa prevalente en Lima que,

probablemente, adquirió diversidad genética tras un período de circulación prolongado. Los aislados de Lima se localizaron en las redes de relación en posiciones previas a las identificadas en Europa, apoyando que la direccionalidad de la transmisión fue de Perú a Europa.

La WGS ha permitido confirmar, en otras ocasiones, la exportación de cepas TB-MDR desde países de alta carga de TB, a países de baja carga de Europa. Walker *et al.*, [117] en 2018 identificaron la presencia de una misma cepa MDR (<2 SNPs), procedente del Cuerno de África, en 29 pacientes de 7 países diferentes. El estudio permitió concluir que, con mucha probabilidad, la transmisión ocurrió a lo largo de la ruta de migración y no en cada uno de los países receptores.

Por lo tanto, los movimientos migratorios globales predisponen a la población a un recambio constante de cepas que involucra, en ocasiones, la transferencia de cepas de alto riesgo, como las cepas TB-MDR, que se asocian a un manejo más complejo de la enfermedad [285]. Esta situación ha llevado a algunos de los países receptores de un mayor número de migrantes y refugiados, como Australia, Canadá, Nueva Zelanda, Reino Unido y Estados Unidos a desarrollar planes estratégicos y colaborativos para prevenir la importación de cepas de alto riesgo en cada uno de estos países [286]. Estos esfuerzos son fútiles si no van acompañados de programas de vigilancia y control de la transmisión, apoyados en técnicas moleculares y/o genómicas, tras la llegada de estos migrantes a los países receptores. La vigilancia y el control de la TB requiere de la integración de esfuerzos a nivel local, nacional e internacional, para identificar de forma precoz la distribución de cepas de alto riesgo.

2. Evaluación de alternativas para la vigilancia epidemiológica de TB en entornos complejos carentes de sistemas de genotipado sistemático

Las estrategias de epidemiología molecular han sido claves para conocer la distribución de cepas de MTB, aportando una visión global de las dinámicas de

transmisión en una determinada población. Además, nuestro conocimiento de las pautas de transmisión de la TB ha mejorado notablemente desde la implementación de la epidemiología genómica. Pero la realidad es que la utilización de la genómica como herramienta para la vigilancia de la transmisión en países de alta incidencia de tuberculosis está lejos de poderse establecer. En su mayoría, estos países, no cuentan siquiera con los requerimientos mínimos para desarrollar las técnicas de epidemiología molecular convencional, y cuentan generalmente únicamente con pequeños estudios realizados en momentos puntuales y utilizando generalmente muestras de conveniencia. Por todo ello, es necesario establecer estrategias alternativas de vigilancia de la transmisión de la tuberculosis adaptados a entornos alta incidencia y recursos limitados.

2.1 Panamá como modelo de estudio

Con el fin de evaluar la viabilidad de una aproximación simplificada de vigilancia de la tuberculosis, seleccionamos Panamá, como modelo de país que carece de un programa sistemático de estudio de la transmisión de la TB basado en epidemiología molecular. Panamá, a pesar de ser uno de los países con mayor crecimiento económico en Centroamérica, presenta una alta tasa de incidencia de TB (41.4 casos /100,000 habitantes) [287], considerándose el segundo país con mayor número de casos de TB en la región [10] y el que presenta la mayor tasa de muertes por esta enfermedad.

Los escasos estudios de genotipado de MTB realizados en el país, muestran datos dispares, probablemente como resultado de las diferentes muestras de conveniencia seleccionadas. El 16 % (37/231 aislados) de los casos MDR genotipados durante el período 2002-2004 formaban parte de cadenas de transmisión y fueron identificados principalmente en las provincias de Panamá y Colón [288]. En otro estudio del año 2014, Sambrano *et al.*, reportaron que el 21% de los casos de cepas sensibles aisladas en 2005 y pertenecientes a un sólo centro

de salud, estaban formando parte de clusters de transmisión utilizando como técnica de genotipado el panel de 12 loci de MIRU-VNTR [289]. Son también muy escasos los estudios en los que se utilizó la WGS como herramienta epidemiológica, en 2013 se realizó un estudio [290] en el que se empleó la genómica para caracterizar 66 aislados MDR en Panamá, el resultado mostró que el 44% de ellos pertenecía a una misma familia LAM9-c1 y que todas las cepas presentaban las mismas mutaciones de resistencia, pero no se analizó la diferencia de SNPs entre cepas ni se aplicaron los umbrales definidos por Walker *et al.*, [107] para establecer la vinculación directa entre los aislados.

Los diferentes estudios puntuales y aislados, basados en epidemiología molecular y genómica de la tuberculosis, realizados en Panamá permiten vislumbrar una tasa elevada de transmisión de cepas sin que exista una caracterización genotípica de forma sistemática. Esto implica la existencia de intervalos de tiempo vacíos de información entre un análisis y otro, poniendo sobre la mesa la necesidad de intervenir para completar la información, fortalecer la vigilancia epidemiológica y reducir las tasas de transmisión en el país.

Además, Panamá, debido a su la localización geográfica, se considera un punto de conexión estratégico en Centroamérica donde existe un movimiento migratorio constante que favorece la entrada de cepas inéditas en el país de alto riesgo (cepas MDR o altamente transmisibles). Al impacto socioepidemiológico derivado de la llegada masiva de trabajadores de diferentes partes del mundo a mitad del siglo XIX para la construcción del propio Canal de Panamá y del Ferrocarril Interoceánico, debemos de añadir la nueva entrada reciente de mano de obra extranjera para la ejecución de la expansión del canal inaugurado en el año 2015.

El conjunto de estas circunstancias epidemiológicas, geográficas y socioeconómicas nos llevaron a seleccionar Panamá como modelo para evaluar la implementación de una nueva estrategia simplificada basada en WGS, pero adaptada a formatos moleculares sencillos y de bajo coste, para la optimización de

la vigilancia de la TB en países de alta carga de enfermedad, que carecen de un programa sistemático de control de la transmisión.

2.2 Descripción de la estrategia y experiencia previa

El primer paso para la adaptación de esta estrategia a una población es la identificación de las cepas cuya vigilancia deba de ser priorizada, por corresponder a las cepas responsables del mayor número de casos en cluster en el entorno seleccionado.

Una vez identificadas las cepas de interés se debe realizar la WGS de algunos de los aislados representantes del cluster para identificar sus marcadores específicos. Para ello, los SNPs comunes a todos los aislados de las cepas de interés se filtran con una base de datos que contiene los SNPs de más de 4700 genomas procedentes de todo el mundo, seleccionados minuciosamente como representantes de la diversidad global, de modo que, aquellos SNPs de nuestras cepas en estudio que no estén presentes en la base de datos se consideran como SNPs marcadores específicos de estas cepas.

La última etapa consiste en diseñar PCRs alelo específicas (ASO-PCRs: allele-specific oligonucleotide-PCR) multiplex que permitan la identificación de 3-4 de estos SNPs marcadores de forma simultánea y, por ende, la identificación de forma específica de la cepa de interés. La aplicación *in situ* de estas ASO-PCRs es muy sencilla, requiere una dotación mínima de equipamiento (un termociclador y un sistema de electroforesis), es muy fácil de interpretar y el costo de su aplicación es muy bajo.

Esta estrategia se ha utilizado con diferentes objetivos en distintos países. Permitió la actualización de la situación de las 2 cepas TB-MDR más problemáticas circulantes en Argentina y responsables de casi el 40% de los casos MDR del país, según las cifras obtenidas en los últimos estudios realizados en 2009, inmediatamente antes de que la restricción económica impidiese seguir aplicando

programas de vigilancia de la transmisión de la TB en el país [142]. La aplicación de estas PCRs constituye la única opción de mantener la vigilancia prospectiva de ambas cepas MDR en un país que carece de recursos para implementar técnicas de epidemiología molecular de forma sistemática. En otro estudio, la identificación de una misma cepa de TB- MDR en migrantes procedentes de Guinea Ecuatorial en distintas ciudades de España, alertó de la posible presencia de una cepa mayoritaria MDR prevalente en ese país. La falta de recursos para el análisis de resistencias y para abordar estudios de epidemiología molecular en Guinea Ecuatorial impedía conocer la situación real en el país. Se diseñó una ASO-PCR para la vigilancia específica de esta cepa y se aplicó sobre una muestra de 158 cepas recogidas consecutivamente en un período de tiempo de 3 meses en Guinea Ecuatorial. La cepa en estudio representó el 44% de los casos de cepas resistentes a rifampicina analizadas, confirmando la alta prevalencia de esta cepa y permitiendo etiquetar, con una sola PCR, a casi la mitad de los aislados con resistencia a rifampicina circulantes en el país. Del mismo modo, otras ASO-PCRs han sido diseñadas y aplicadas con otras finalidades [124, 125, 129], como la actualización de la situación de una cepa del linaje Beijing responsable de un brote masivo en la isla de Gran Canaria, donde pasó a suponer el 21% de los casos de TB de la isla en 2008 desde su introducción en 1993 [127, 291]. La aplicación de una ASO-PCR específica de esta cepa permitió establecer que la cepa sigue presente 20 años después en la isla en un porcentaje del 20% y que, además, está presente en el resto de las islas del archipiélago [127].

2.3 Adaptación de la estrategia de vigilancia alternativa en Panamá

Para la evaluación de la estrategia en Panamá se requería un estudio previo retrospectivo de las cepas responsables de las cadenas de transmisión de mayor magnitud en el país. Se llevó a cabo el genotipado mediante MIRU-VNTR de un grupo de cepas aisladas durante un año (2015) en las provincias de Panamá y

Colón. Este análisis reveló una alta proporción de clusters (50%) una cifra muy superior a la descrita en la mayoría de los estudios poblacionales realizados (30%-45%) [292-294], lo que sugiere una transmisión activa no controlada de TB en el país. A pesar de que la muestra analizada en nuestro estudio fue limitada, el porcentaje de casos en cluster fue muy superior al 21% obtenido en un estudio anterior (2005), que incluyó a cepas sensibles [289]. Otro estudio realizado en 2002-2004 en las mismas provincias de Panamá y Colón, en el que solo se incluyeron cepas MDR, ofreció un porcentaje de casos en cluster del 82.9% [288]. En nuestro estudio, sólo un 1.1% de los aislados fueron MDR y ninguno formó parte de los 6 clusters de transmisión mayoritarios descritos. Todos estos datos muestran un marcado cambio en la composición general de cepas y en la dinámica de transmisión en el país a lo largo de los períodos de estudio mencionados (2002 y 2015).

Otro de los hallazgos interesantes encontrados tras el genotipado de las cepas del estudio, fue la distribución diferencial de los clusters de transmisión en las 2 provincias analizadas. A pesar de encontrarse a solo 74 km de distancia y tener una buena comunicación de carreteras, cuatro de los clusters están mayoritariamente representados en la provincia de Panamá y los otros 2 en la provincia de Colón, alertando sobre las particularidades epidemiológicas de cada población. La separación observada en la circulación de cepas implica que se debe trabajar de forma independiente en el desarrollo de herramientas de vigilancia y en las intervenciones de control de las cepas circulantes en cada población.

La aplicación de la herramienta *on-line* "TBminer" sobre los genotipos obtenidos mediante MIRU-VNTR, permitió asignar los linajes y sublinajes de las cepas analizadas [295]. Llama la atención, fundamentalmente, la identificación de una cepa de la familia Beijing responsable de uno de los clusters mayoritarios descritos (cluster A). Las cepas de la familia Beijing muestran una gran relevancia epidemiológica y clínica, puesto que, han sido responsables de grandes brotes y se

ha propuesto que pudieran presentar cierta capacidad hipermutadora que les podría facilitar la adquisición de mutaciones de resistencia [144, 296].

Una vez identificadas las cepas mayoritarias decidimos aplicar la nueva estrategia de vigilancia dirigiéndonos a tres de los clusters (A, B y C) que agruparon el mayor número de casos. Se llevó a cabo la secuenciación de genoma completo de varios representantes de cada uno de estos clusters y se reveló que solo uno de ellos (cluster C) estaba formado por aislados con una estrecha vinculación genómica (<5 SNPs), consistente con una dinámica de transmisión reciente. Por el contrario, los otros 2 clusters ofrecieron distancias genómicas por encima de 12 SNPs, descartando a la transmisión reciente como responsable de estos clusters y sugiriendo que, probablemente, se trate de cepas prevalentes circulantes en el país, que han acumulado una mayor diversidad genética.

La observación de que cepas que comparten un mismo MIRUtipo muestran distancias genómicas que rompen la supuesta vinculación reciente asumida por el genotipado inicial ha sido descrita en otros estudios [115, 117]. El análisis por WGS realizado en migrantes procedentes de Marruecos diagnosticados en la provincia de Almería, que compartían un mismo genotipo por MIRU-VNTR, permitió diferenciar los 8 casos que eran resultado de una cadena de transmisión reciente en el país de destino, y descartar a otros casos no relacionados, resultado de importaciones independientes [115]. La capacidad de WGS para diferenciar casos implicados en transmisión reciente de aquellos resultados de importaciones independientes es un aspecto de gran relevancia epidemiológica, puesto que la intervención requerida en cada situación es completamente diferente.

La etapa final de la estrategia alternativa propuesta implica el diseño de herramientas moleculares sencillas para optimizar la vigilancia en Panamá. Utilizando la información aportada por la WGS de las cepas seleccionadas se identificaron los SNPs específicos de cada cluster y se diseñaron ASO-PCRs para la identificación de las tres cepas mayoritarias agrupadas por MIRU-VNTR para

aplicarlas de forma prospectiva, con una doble intención, i) capturar nuevos casos en transmisión activa del denominado cluster C e ii) identificar nuevos miembros de los clusters prevalentes con la intención de completar la reconstrucción filogenética histórica de estas 2 cepas (A y B). Según los datos obtenidos por MIRU-VNTR, la aplicación de estas tres PCRs permitiría identificar el 32% de los casos circulantes en las 2 provincias analizadas. Este aspecto se confirmó al aplicarse prospectivamente el set de PCRs a 51 aislados obtenidos en 2018; puesto que en el 31.4% de los casos se identificó a una de las tres cepas en estudio como implicada en la infección. La cepa A fue la que se identificó con mayor frecuencia (25.5%), siendo la gran mayoría de los pacientes (84.6%) de la provincia de Colón, mientras que, el 1.9% y el 3.9% de los casos fueron debidos a las cepas B y C, respectivamente, ambas diagnosticadas preferentemente en pacientes procedentes de la ciudad de Panamá.

Finalmente, se realizó la WGS de los casos capturados prospectivamente gracias a la aplicación de esta estrategia alternativa. La representación gráfica de la distribución de SNPs de los 3 clusters reflejó lo que indicaba la secuenciación de los primeros aislados. Todas las cepas pertenecientes al cluster C presentaron menos de 5 SNPs entre 2 casos adyacentes, subrayando la vinculación directa entre los casos, y su carácter de transmisión reciente. Por el contrario, las cepas pertenecientes a los clusters A y B mostraron una diversidad considerablemente mayor, probablemente asociada a la adquisición de SNPs resultado de la circulación prolongada de estas cepas en la población.

La fuerte correlación entre el porcentaje de los nuevos casos causados por las tres cepas en estudio en 2018 de forma prospectiva (31.4%) y de los casos previos identificados en 2015 (32%), revela una composición estable de las cepas en estas regiones en los 3 años de estudio.

En resumen, la estrategia evaluada en este estudio demuestra cómo la integración de los resultados obtenidos mediante tres técnicas diferentes (MIRU-

VNTR, WGS y ASO-PCRs), puede generar un nuevo modelo de vigilancia de la transmisión de la TB en países sin programas de epidemiología molecular o genómica. Con la aplicación de MIRU-VNTR se observó una alta tasa de cepas en cluster (50%), lo que alertó de la necesidad de establecer sistemas de control de la transmisión. La WGS permitió desvelar que algunos de esos clusters no formaban parte de cadenas de transmisión activas/recientes, sino que se trataba de cepas prevalentes circulantes en el país y, además, sirvió para obtener los marcadores específicos requeridos para el diseño de las ASO-PCRs destinadas a la identificación específica de las cepas. Y, finalmente, la aplicación de estas últimas de forma prospectiva permitió identificar el 31.4% de los nuevos casos diagnosticados. Todo ello demostró la de una estrategia barata, sencilla y rápida, que permitirá vigilar de forma progresiva la evolución de las cepas más problemáticas de la población y analizar el resultado de las intervenciones establecidas. Estas ASO-PCRs son herramientas flexibles y dinámicas que pueden modificarse y adaptarse a la realidad de cada momento y a las necesidades del entorno poblacional, descatalogando aquellas que vigilen cepas finalmente controladas e introduciendo nuevas PCRs para cepas emergentes.

3. Cepa Beijing predominante en la provincia de Colón, Panamá.

3.1 Descripción del evento y análisis comparativo

Un 7.4% del total de cepas aisladas entre Panamá y Colón correspondió al linaje Beijing, y todas ellas formaron parte del mismo cluster, mayoritariamente localizado en Colón. Sambrano *et al.*, [289] reportó un 3.7% de cepas de la familia Beijing en el año 2005 restringidas a la ciudad de Panamá, mientras que en el estudio realizado sobre cepas MDR en 2002-2004, que incluía ambas provincias, no se encontró ninguna cepa de esta familia [288]. De manera que, podemos asumir que la entrada en Colón de esta cepa Beijing fue relativamente reciente.

La alerta asociada a la identificación de cepas Beijing deriva de su asociación con una elevada transmisibilidad [19, 297]. Además del caso previamente descrito

de una cepa Beijing de propagación extensiva en la isla de Gran Canaria (España), existen otros casos descritos de cepas Beijing MDR prevalentes en Estados Unidos, Perú, Japón, Rusia y China [20, 296-299].

El disponer de una herramienta molecular que identifica específicamente a la cepa A de la familia Beijing permitió conocer que las cifras correspondientes al 2018 ascendían marcadamente, con un 25.5% de los nuevos casos infectados por este linaje, lo que ratifica su carácter altamente transmisible. La distribución mayoritaria (21.5%) y singular de la cepa A en Colón, justificó nuestro interés en atender prospectivamente a la vigilancia de la cepa A en esta provincia. Nuestro estudio prospectivo indicó que la cifra de nuevos casos de TB por la cepa Beijing A fue en aumento en esta provincia, alcanzando el 41% de los casos, mientras que un año más tarde notamos que esta cifra aumentó hasta el 57%.

La presencia predominante de una cepa en una población determinada puede ser el resultado de factores epidemiológicos o de la propia cepa. Determinados escenarios epidemiológicos pueden proveer condiciones ideales de transmisión y persistencia para determinadas cepas. Tales entornos pueden ser, poblaciones con escasa movilidad, escenarios cerrados o con intercambio reducido, tales como prisiones, albergues, o contextos marginales que ofrecen los factores socioambientales ideales para generar reservorios de transmisión activa y de cepas prevalentes de MTB. En el caso de Colón, los casos de TB fueron diagnosticados en la población general, sin que estén enriquecidos en algún subgrupo poblacional o entorno determinado. Una explicación plausible es la alta tasa de incidencia de TB en esta provincia, que alcanzó 55.5/100,000 habitantes durante el período 2017, siendo la segunda provincia de Panamá en número de casos de tuberculosis reportados (122 casos TB en el 2017) [287]. Además, presentaron una alta tasa de coinfección por VIH-TB, cerca de 40% durante ese año. Estos dos factores combinados con el bajo nivel socioeconómico de Colón, alto índice de pobreza y las condiciones de hacinamiento podrían favorecer la transmisión de cepas de MTB.

Aunque es cierto que, se han realizado esfuerzos colaborativos para fortalecer el sistema de salud, estos siguen siendo muy escasos para entender la situación sanitaria en Colón y en la población nacional [300].

Desde el punto de vista de los factores de la propia bacteria que pueden justificar su preponderancia en una población, diferentes estudios han descrito la presencia mayoritaria del linaje Beijing en el Sureste y Este de Asia: del 23% en Indonesia [301], más del 59% en Vietnam [302] y hasta el 83.3% de los casos reportados en el área metropolitana de China [303], siendo su prevalencia en otros países muy variable [20, 298]. Su capacidad de generar eventos de transmisión activa de gran magnitud, así como su mayor capacidad en adquirir resistencias/virulencia han sido asimismo estudiados [19, 281, 297]. Estas características pueden conducir a una transmisión predominante de cepas representantes de este linaje, que pueden conducir a su predominio durante décadas en un mismo contexto geográfico, tal y como se describió en Gran Canaria [127, 291].

Si bien el linaje Beijing se ha asociado a una mayor tendencia a protagonizar situaciones de mayor prevalencia, la transmisión predominante de una cepa en una población no está asociada únicamente a cepas de este linaje. Así, nuestros hallazgos para la cepa Beijing A en Colón fueron similares a los descritos por Tuite *et al.*, [304] en Toronto, donde se describió el incremento y la propagación continua de casos de TB producidos por una cepa predominante del linaje 4 (Euro-American).

Del mismo modo, en un estudio realizado en Zaragoza, tras la alerta derivada del elevado porcentaje de casos de TB en cluster (46.5%) [305] se identificó el predominio de una cepa sensible no perteneciente al linaje Beijing (cepa MTZ), responsable del 52.6% de los casos en cluster [306]. En este contexto se desarrolló también una PCR específica como medida de vigilancia y control [307].

A la hora de identificar contextos en los que se han descrito cepas exitosas que han demostrado una transmisión eficaz durante períodos prolongados de tiempo, no podemos dejar de mencionar a la cepa DKC2/1112-15 en Dinamarca. Se observó un incremento del 5.6% al 29.0% de casos debidos a esta cepa entre los años 1992 y 2001 [308], el predominio de la cepa DKC2/1112-15 se expandió a Groenlandia lo que condujo al incremento de un 3.9% de los casos en la isla [309]. A pesar de que el país presenta una baja tasa de incidencia de TB, el cluster DC2/1112-15 sigue siendo un reto de control de la TB en el país [310].

Si, a diferencia de las situaciones discutidas hasta el momento, que implican a cepas predominantes sensibles, pasamos a considerar cepas MDR, encontramos ejemplos notorios de dominancia de determinadas cepas en una población. Uno de los mejores ejemplos es Argentina, donde se ha documentado la transmisión activa de tres cepas MDR representantes del linaje 4 responsables del 45.1% del total de casos MDR del país [112, 142].

Volviendo a nuestro elemento de estudio, la cepa Beijing A en la provincia de Colón, a diferencia de las situaciones previamente presentadas, carece de registros históricos o reportes previos, que nos ayuden a comparar o corroborar la transmisión de este genotipo Beijing en la provincia. Únicamente disponemos de algunos estudios puntuales de epidemiología molecular que sólo aportan datos fragmentados que impiden una comparación cronológica de la transmisión de la cepa A. Por tanto, era necesario intentar profundizar en el estudio detallado de este cluster, que nos ayudara a intentar reconstruir la historia de la entrada y distribución de esta cepa en Colón.

3.2. Caracterización genómica, estudio filogenético y reconstrucción histórica

El análisis detallado de la distribución de SNPs de todos los aislados de la cepa Beijing A permitió definir la red de relaciones filogenéticas entre los casos y

comprender la verdadera naturaleza del evento. La asunción inicial de encontrarnos ante un evento de transmisión reciente activa pudo ser descartada ya que el análisis por secuenciación genómica nos permitió desvelar una marcada diversidad genética, que distribuía a la mayor parte de los aislamientos a lo largo de diferentes ramas del árbol. Esta topología era más consistente con una cepa con presencia prevalente en la población, cuyo tiempo prolongado de circulación, había conducido a una diversidad superior a la esperada para un evento de transmisión activa reciente. Únicamente, subgrupos de un número reducido de casos compartieron distancias genéticas más cortas, lo que probablemente sugería la existencia de eventos de transmisión reciente autolimitados, de algunas de las variantes de la cepa A que surgieron en el seno de la diversidad adquirida al ser una cepa persistente.

El estudio detallado de la diversidad de SNPs de la cepa A no sólo arrojó luz sobre la dinámica real de transmisión dentro de este cluster, sino que ofreció un material de referencia para abordar la evolución histórica de la cepa A en Colón, intentar aproximar su posible origen y proponer su posible fecha de introducción en el país.

En una primera etapa, abordamos el estudio comparativo de los rasgos de la cepa A, con los representantes del linaje Beijing de diferentes localizaciones geográficas, previamente secuenciados. El linaje Beijing ha sido dividido en dos sublinajes evolutivos que reciben el nombre de ancestral y moderno [17]. La distribución del sublinaje ancestral es de baja prevalencia (<20% en China, 4% en Rusia), mientras que el moderno tiene en torno a 80% de prevalencia en China, parece haberse localizado en el norte de China por su adaptación a la densidad poblacional [311]. Ribeiros *et al.*, [19] reportaron que las cepas modernas de Beijing fueron altamente patógenas, exhibiendo niveles de alta transmisibilidad y virulencia. En contraste, los aislamientos del sublinaje ancestral mostraron virulencia intermedia o baja, sugiriendo que las características genéticas de las cepas del

sublinaje Beijing moderno favorecen la adquisición de virulencia y mayor probabilidad de resistencia respecto a la cepa antigua [19, 20].

Mediante el análisis genómico comparado, pudimos identificar que la cepa A corresponde al sublinaje Beijing moderno (L2.2.5), en concreto a su rama asiático-africana 3 (Bmyc13). Esta rama aglutina a cepas endémicas y de baja prevalencia, principalmente descritas en el Este de Asia y en el sur de África [145, 312, 313]. De modo complementario, el análisis del patrón MIRU-VNTR de la cepa A permitió encontrar el mismo patrón en aislados de Vietnam. Finalmente, la construcción del genoma ancestral común más reciente, a partir de los datos genómicos obtenidos de los 26 aislados obtenidos en Panamá, permitió identificar 38 SNPs conservados, que son únicos dentro de L2.2.5. A partir de estos datos se pudo establecer una fuerte correlación con cepas aisladas en Vietnam.

Los datos obtenidos de genómica comparada podrían sugerir una posible zona de origen para la ruta de importación de la cepa Beijing A en Panamá. Sin embargo, hay que ser cauto con esta hipótesis, ya que un posible análisis comparativo más exhaustivo entre la cepa A y aislados Beijing modernos circulantes en Vietnam está impedido por la escasa presencia de aislados de este sublinaje en las bases de datos (0.7%, 11 aislados, de los 1500 aislados de Vietnam secuenciados). A esta limitación debemos de añadir la carencia de datos epidemiológicos, incluyendo la información del país de origen, de los casos en estudio en Colón.

A pesar de la falta de datos sólidos que permitan asentar esta hipótesis, es atractivo valorar la posible introducción de la cepa A como resultado de la migración masiva de asiáticos y afrocaribeños a finales del siglo XIX, que llegaron como resultado de la demanda de mano de obra para la construcción del Canal de Panamá. Del mismo modo en que se ha descrito la asociación de este evento con otras enfermedades como la fiebre amarilla y la malaria, se podría proponer la introducción del sublinaje Beijing moderno en Panamá.

En otros países donde se ha descrito, asimismo, una presencia relevante del sublinaje Beijing, se han realizado esfuerzos semejantes para proponer posibles hipótesis de rutas de importación. Así, se ha determinado que las cepas representantes de los genotipos Beijing pudieron haberse introducido en Perú a mediados del siglo XIX, como resultado de la migración de inmigrantes chinos [314]. Esta situación, Iwamoto *et al.*, [298] derivó en la descripción de un genotipo Beijing (PCT001) representada en el 43.9% de las cepas, tras comparar MIRU-VNTR a nivel global, sugiriendo que el genotipo emergió como un clon único en Perú, presente en Lima desde 1999.

Como último nivel en la reconstrucción histórica/evolutiva de una cepa en una población, es posible inferir las etapas previas, donde el muestreo poblacional no fue posible, a partir del estudio de la diversidad adquirida en los períodos más recientes, donde se cuenta con datos genómicos. De modo general, para el linaje Beijing, se han estudiado sus características evolutivas en paralelo a su período de propagación intercontinental. Se han podido proponer múltiples introducciones a África, durante los últimos 300 años de representantes Beijing vinculados a poblaciones del Este y Sudeste de Asia [315].

En el caso de la cepa A de Colón, a pesar de requerirse un mayor número de representantes secuenciados para abordar la reconstrucción evolutiva de una cepa en una población, intentamos aproximar este problema. A partir de estos estudios se obtuvieron datos generales de tasas de mutación y diversidad de SNPs acumulados. La tasa de mutación de la cepa A fue de 1.6 sustituciones por genoma por año, muy superior a la de 0.3-0.5, revelado en otros estudios poblacionales [107, 110], pero consistente con las tasas de sustitución normalmente elevadas observadas en linajes Beijing [316, 317].

El valor estimado para la cepa A es asimismo superior a las tasas de sustitución descritas para otras cepas prevalentes; siendo 0.29 para la cepa M en Argentina [112] ó 0.21 para el cluster DKC2/1112-15 de Dinamarca [114]. En cuanto

al promedio de diversidad de SNPs observado en los casos de la cepa A en Panamá, (1.5 SNPs por caso; 38 SNPs/26 aislados), los valores fueron similares a los descritos para otras cepas prevalentes; 1.5 SNPs (81 SNPs/55 aislados) en Toronto [318] y 2.0 SNPs (133 SNPs/68 aislados) en Suiza [319], aunque superiores todos ellos a los 0.8 SNPs descritos para una cepa predominante con baja variación genómica reportada en Londres [120].

Los estudios de reconstrucción evolutiva, además de ofrecernos información general acerca de las tasas de sustitución y diversidad permite conocer el posible ancestro común más reciente, que ayuda a estimar el momento de introducción de una cepa en la población. Así, se ha estimado que el progenitor de la cepa M en Argentina se localizó hace cuatro décadas, y adquirió resistencia a medicamentos de primera línea alrededor de 1973 [112]. Del mismo modo se ha podido inferir que la cepa DKC2/1112-15 pudo tener su origen en Rusia hace unos 200 años, introduciéndose por vez primera en Dinamarca alrededor del año 1966 [114].

La inferencia evolutiva abordada para los aislados de la cepa A identificados en Panamá indicó que estos convergen en un punto de tiempo entre los años 2000 y 2012, rango de tiempo que correspondería con la fecha probable de introducción de la cepa en Panamá. Cuando abordamos una aproximación equivalente para las cepas tanto de Panamá como de Vietnam próximas a ellas, la convergencia común ocurre en un intervalo de tiempo de 1987 a 1995.

En este sentido, la cronología propuesta en el modelado de reconstrucción histórica descarta la introducción de la cepa Beijing A en Panamá como resultado de la migración acaecida durante la Construcción del Canal de Panamá. Esta cepa es mucho más reciente en el país, ya que lleva circulando únicamente durante las dos últimas décadas. Tampoco parece estar relacionada a la reciente expansión del Canal de Panamá en el 2015, ya que circula desde años anteriores. Probablemente su introducción no está asociada a momentos clave que han requerido la entrada masiva de migrantes.

4. Transmisión de patógenos relevantes en el entorno nosocomial

Las técnicas en las que descansan las estrategias de epidemiología molecular discutidas en el bloque de esta tesis relacionado con la vigilancia de la transmisión no deben de quedar restringidas a la vigilancia de la transmisión comunitaria, como ocurre en la tuberculosis, pudiéndose asimismo replicar en el marco de la infección nosocomial protagonizada por otros patógenos.

A pesar de la mejoría en las medidas de control, los eventos de infección nosocomial, que acontecen más de 48 horas después del ingreso del paciente en el hospital, se mantienen como un problema persistente de Salud Pública [166]. Es necesario implementar nuevas estrategias para optimizar su control y así evitar el aumento en la mortalidad y morbilidad derivados y reducir su impacto económico, derivado de la hospitalización prolongada y los costes multifactoriales directos e indirectos [174, 175]. Como ejemplo, en Estados Unidos, se estimó un incremento del 4.3% en el gasto sanitario en el año 2015 (~3 billones de dólares) derivado de las infecciones nosocomiales [320].

Las infecciones asociadas al sistema de salud pueden tener un origen endógeno, siendo las bacterias colonizadoras de las mucosas del paciente la fuente primaria de infección, o exógeno, con la participación del personal médico-sanitario, visitas, dispositivos médicos/quirúrgicos, o del entorno ambiental hospitalario. De este modo, la transmisión nosocomial puede estar mediada por contacto de persona a persona, o implicar bien al entorno o a dispositivos contaminados. Es indudable que el impacto de la infección nosocomial es máximo cuando implica a microorganismos multirresistentes o extremadamente resistentes (MDR/XDR), especialmente cuando, resultado de las dificultades inherentes a su control se extienden a la comunidad.

En este trabajo, con objeto de abordar la implementación de técnicas moleculares y de genotipado, e incluso de análisis genómico, en la optimización de

la detección y caracterización de infecciones nosocomiales, decidimos seleccionar dos modelos de problemas infecciosos nosocomiales. En la selección de estos dos problemas pretendimos ejemplificar los dos grandes tipos de evento de infección nosocomial: 1) de ámbito global, ocasionado por dispositivos sanitarios utilizados de modo general y 2) de ámbito local, resultado de dinámicas de transmisión persona-persona. Más concretamente, seleccionamos el análisis de las infecciones causadas por *Mycobacterium chimaera*, asociadas al uso de dispositivos “heater-cooler” (HCU) utilizados en cirugía cardíaca y el estudio de un brote hospitalario de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.

4.1. *Mycobacterium chimaera* como modelo de infección nosocomial de impacto global.

La infección nosocomial por *M. chimaera* ha significado una emergencia de salud pública de impacto global, como resultado de la exposición de pacientes sometidos a cirugía cardíaca a los aerosoles generados por máquinas “heater-cooler”, contaminadas por *M. chimaera*, que contienen a este microorganismo en suspensión.

Los primeros casos fueron reportados en 2013 en Zúrich (Suiza) [193] en pacientes que compartían el haber sido sometidos a cirugía cardiotorácica, especialmente cirugía a corazón abierto, y que mostraban complicaciones cardíacas (endocarditis de la válvula protésica). Posteriormente, el fenómeno se extendió hasta alcanzar una dimensión mundial [194], dada la distribución mayoritaria un mismo modelo de dispositivo [191]. Hasta el momento, se han notificado más de 140 casos de infección invasiva grave causada por este patógeno, asociadas a exposición a unidades de HC tras cirugía cardiotorácica [194]. Sommerstein *et al.*, [205] recrearon un modelo de dispersión de partículas que demostraba la transmisión en el aire desde los tanques de agua de la unidad de enfriador-calentador a los pacientes durante la cirugía a corazón abierto. El análisis

genotípico de algunos de los aislados en Estados Unidos permitió, asimismo, determinar la agrupación genética entre los aislamientos obtenidos de HCUs con aislados clínicos del brote global por *M. chimaera* asociados a cirugía cardíaca [197].

En España, disponemos de escasos estudios respecto al problema de *M. chimaera*. Se han comunicado dos casos de endocarditis por *M. chimaera* en Barcelona [321] y recientemente Zegri-Reiriz *et al.*, [322] reportaron un nuevo caso de endocarditis por este microorganismo. Existen una serie de factores que pudieran justificar que nos estemos enfrentando a una infradetección de casos: 1) el largo período de latencia (hasta 72 meses) entre la exposición durante la cirugía y el desarrollo de síntomas; 2) los signos y síntomas inespecíficos durante las infecciones; y 3) las limitaciones metodológicas para lograr una identificación precisa a nivel de especie [323].

Considerando los aspectos mencionados, identificamos la oportunidad de desarrollar una estrategia, basada en diagnóstico molecular que nos permitiera cubrir las dos demandas destapadas por este problema emergente: 1) la necesidad de actualizar retrospectivamente, con rapidez, posibles infecciones por *M. chimaera* que hubieran pasado desapercibidas, y 2) la necesidad de instaurar un procedimiento de identificación prospectiva precoz de este microorganismo sobre muestras ambientales.

4.1.1. Identificación de *M. chimaera* en muestras clínicas y ambientales por PCR en tiempo real.

Nuestro objetivo era el de evitar los retrasos inherentes a los procedimientos habituales del cultivo y de la identificación estándar de este microorganismo. La decisión natural fue la de apoyarnos en una PCR en tiempo real específica, capaz de abordar la identificación directa en muestras clínicas y ambientales. La necesidad de garantizar una identificación de alta especificidad nos condujo a seleccionar una

PCR que hubiera sido diseñada siguiendo los nuevos paradigmas de caracterización genómica. En concreto, seleccionamos una PCR en tiempo real [209] que descansa sobre un exhaustivo análisis *in silico* de secuencias de genoma completo que facilitó la identificación *de novo* de una diana específica de *M. chimaera*. Este desarrollo garantiza la ausencia de reacciones cruzadas con especies cercanas y escapa a la inespecificidad de la que, hasta el momento, adolecía el abordaje diagnóstico de este patógeno, en el que habitualmente sólo se llegaba a determinar el complejo MAC, en el que se incluye esta especie. Por tanto, esta PCR ofrecía la capacidad de discriminación necesaria para cubrir nuestro objetivo de acelerar la identificación sobre muestra directa, asegurando precisión diagnóstica con fines clínicos y epidemiológicos, que pudiera llevar a intervenciones precoces.

Primeramente, aplicamos la PCR retrospectivamente sobre una colección de 15 aislados con significación clínica, obtenidos a lo largo los últimos 10 años, en los que únicamente se había llegado a identificar complejo MAC (2010), para abordar nuestro primer objetivo, el rastreo de infecciones por *M. chimaera* infradiagnosticadas. Nuestra estrategia reveló una infección de este tipo, que correspondió a un paciente con un cuadro de infección severa que le condujo a la muerte tras un año de continuo tratamiento. Una revisión retrospectiva de su historia clínica desveló que un año antes del aislamiento fue sometido a un reemplazo de válvula aórtica y a una reparación mitral, lo que alineaba a este caso con los descritos en la literatura [193]. El hecho de que la infección en este paciente hubiera pasado desapercibida, así como su relación con la cirugía cardíaca, podía estar justificado parcialmente por el hecho de que la cirugía cardíaca se había realizado en un centro diferente, que no pertenecía al Sistema Nacional de Salud. Tras el hallazgo microbiológico, se comprobó que las máquinas HC usadas para la cirugía cardíaca en ese hospital correspondían al modelo Stöckert 3T, y el cultivo sistemático del agua de esos dispositivos condujo al aislamiento de *M. chimaera*,

todo lo cual subrayaba la hipótesis de la adquisición de *M. chimaera* como resultado a la exposición a HC contaminados.

Como complemento de la aplicación de la PCR en tiempo real para el rastreo retrospectivo, analizamos el total de muestras de válvulas prostéticas desde 2013 de pacientes con endocarditis en los que la PCR 16S había sido negativa. En ninguna de las 59 muestras se detectó la presencia de *M. chimaera*.

Tras haber mostrado la utilidad de la PCR en tiempo real para actualizar las infecciones por *M. chimaera* en nuestra institución, lo que llevó a mostrar que habíamos estado afectados por este problema global, urgía activar su monitorización prospectiva. Nuestra intención era dotar a esa misma PCR de un fin dual, retrospectivo y prospectivo, y en este caso dirigido a la vigilancia ambiental.

Dentro del fin de vigilancia epidemiológica, la PCR se aplicó sobre las muestras de agua de los 4 dispositivos modelo Söckert 3T de nuestro hospital, revelándose la presencia de *M. chimaera* en dos de ellas, lo que nos condujo a fortalecer y establecer nuevas medidas de control sanitario en las máquinas contaminadas, de modo similar a los planes de desinfección regular y monitorización programada propuestos en la literatura [191]. La persistencia de *M. chimaera* derivada de su capacidad de formar biopelículas hacen que el control y la esterilización total de los dispositivos constituya un reto, lo que obliga a la monitorización continua de su presencia. Nuestra estrategia basada en PCR en tiempo real se adaptó adecuadamente a la necesidad de rastreo mensual programado y permitió obtener resultados precozmente sin la necesidad de esperar a los resultados del cultivo.

4.1.2. Análisis genómico de *M. chimaera*

A pesar de que resultaba sólida la relación entre los aislados de *M. chimaera* obtenidos de pacientes sometidos a cirugía cardíaca y la contaminación detectada en los dispositivos HC, el objetivo de nuestro trabajo era el implementar resolución genómica en la caracterización de los dos modelos de infección nosocomial

seleccionados. El análisis genómico ha sido incluido en diversos estudios relacionados con el tema que nos ocupa y no siempre se ha revelado una relación de clonalidad entre los aislados de *M. chimaera* de los dispositivos HC y los de los pacientes. Robinson et al., tras aplicar secuenciación de genoma completo encontraron que el aislado de *M. chimaera* del paciente no estaba genéticamente relacionado con la HC contaminada a la que se había expuesto, lo que abría la posibilidad a una fuente ambiental diferente.

Sin embargo, estudios más exhaustivos de caracterización genómica, que incluyeron 373 aislamientos procedentes de siete países diferentes, tanto correspondientes a aislados clínicos como ambientales, tomados en su mayoría de HC Stöckert 3T, agrupan con una elevada similitud genómica (Subgrupo 1.1) a la mayoría de los aislados clínicos relacionados con la exposición a HC [200]. Los análisis por secuenciación genómica descritos por Zhang *et al.*, [210] encontraron un máximo de solo 5 SNPs de diferencia entre aislados recuperadas de HC y aislados de pacientes en varios países europeos, Australia, Nueva Zelanda y EE. UU, sugiriendo una fuente común probable de contaminación de los dispositivos, probablemente en el lugar de fabricación de los mismos.

En nuestro caso, la secuenciación genómica del aislado del paciente identificado tras el rastreo retrospectivo mostró una alta proximidad (seis y tres SNP, respectivamente) con el aislado obtenido de los dispositivos HC y con la referencia ZUERICH-1 representante del Subgrupo 1.1, responsable del brote. Estos resultados subrayaban la relación clonal de nuestros aislados con la cepa responsable del brote global. Para refinar nuestro análisis, comparamos los datos genómicos con los datos de WGS de 373 aislamientos obtenidos de varios estudios publicados. Nuestro aislado ambiental compartió una gran similitud con otros aislados publicados, tomados en su mayoría de HC Stöckert 3T, de siete países diferentes, mientras que nuestro aislado clínico se agrupó con el Subgrupo 1.1 aislados, que agrupa principalmente a los aislados de pacientes expuestos a HC,

de tres países diferentes, incluida la cepa ZUERICH-1. Por tanto, nuestros análisis genómicos confirmaron la clonalidad de nuestros aislados con genomas de *M. chimaera* reportados en otros países del mundo, implicados en el brote global. En resumen, nuestros hallazgos constituyen la primera notificación en España de infección diseminada por *M. chimaera* después de una cirugía cardíaca, en el que se ha documentado la similitud genómica con la cepa responsable del brote global de *M. chimaera*.

4.2. Estudio de infección nosocomial por *Pseudomonas aeruginosa* como modelo de un nuevo modo de manejo de brotes.

En el apartado anterior, describimos la magnitud, relevancia e impacto que tienen las infecciones nosocomiales producidas por la exposición a materiales y dispositivos contaminados de uso hospitalario en pacientes. Pero las infecciones nosocomiales, pueden ocurrir también por la transmisión de persona a persona, resultado de la exposición a pacientes infectados o colonizados y a personal sanitario o familiares portadores de cepas. En un estudio poblacional de transmisión sintomática por *C. difficile* (12,717 casos) realizado en 46 hospitales de Inglaterra (2008-2012) se observó que el 75% de los casos tuvieron lugar 48 horas después de su admisión en el hospital, sugiriendo que la transmisión paciente a paciente podría ser la fuente común de adquisición de la infección [324]. El porcentaje de casos potencialmente generados por la transmisión paciente a paciente varía en los diferentes estudios realizados, lo que indica que son, probablemente, muchos los factores implicados en este tipo de transmisiones nosocomiales (el patógeno responsable, el estado del paciente hospedador, el entorno, etc).

Un estudio realizado en Ontario (Canadá), reveló que el 60% de los brotes producidos por *Streptococcus pyogenes*, fueron debidos a la propagación y transmisión de paciente a paciente [182] y en Baltimore (EE. UU) se observó que, el 31% de los casos diagnosticados eran, del mismo modo, derivados de la

transmisión entre pacientes de una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a imipenem [252].

Las medidas de control y vigilancia resultan cruciales para manejar y evitar la transmisión en entornos sanitarios. Un factor que agrava todavía más la situación de la transmisión nosocomial es la infección por patógenos resistentes a fármacos antimicrobianos, debido a la dificultad en el tratamiento, el peor pronóstico del paciente y el mayor gasto asociado. Un estudio realizado por Cosgrove [174], estimó que pacientes que adquieren una infección por microorganismos resistentes de *Staphylococcus aureus*, enterococos o bacilos gramnegativos suponía un aumento en el gasto sanitario en torno a 6,000 a 30,000 dólares con respecto a si la infección era debida a microorganismos sensibles. A estos gastos hay que sumar los que conllevan la implementación de sistemas de vigilancia, control y prevención de las infecciones [174, 175].

Para poder controlar la infección nosocomial es esencial reconocer los brotes emergentes y definir con precisión las cadenas de transmisión, para acotar lo mejor posible la fuente de origen y evitar nuevos brotes en el futuro. Conocer con exactitud el número de pacientes involucrados en la transmisión, facilita la consiguiente intervención para frenar la expansión y permite la identificación precoz de nuevos casos por exposición a pacientes infectados.

Pseudomonas aeruginosa se considera entre los patógenos que con mayor frecuencia causan infecciones nosocomiales y es uno de los más relevantes entre aquellos que provocan infecciones oportunistas en humanos, particularmente afecta a pacientes inmunocomprometidos y pacientes en unidades de cuidados intensivos [229]. Se trata de un patógeno con gran facilidad para desarrollar resistencia a fármacos, lo que conlleva mayores complicaciones en el tratamiento de los pacientes con bacteriemia y neumonía [325]. Por estas razones, seleccionamos una cepa de *P. aeruginosa*-XDR como patógeno modelo para estudiar en profundidad un brote nosocomial identificado en la planta de onco-hematología de

un hospital de Madrid y evaluar la viabilidad de una nueva estrategia molecular para el análisis y vigilancia de brotes en entornos hospitalarios.

Identificar la fuente de un brote es un aspecto crucial de cualquier investigación epidemiológica. Generalmente, los exámenes microbiológicos por cultivo en medio sólido (agar) y las pruebas de sensibilidad (en disco/microdilución) son las primeras aproximaciones para caracterizar fenotípicamente *Pseudomonas* ssp. Estos métodos no permiten identificar una cadena de transmisión ni la fuente inicial de un brote, pero sí pueden alertar de la sospecha de brotes emergentes. Es, por tanto, necesario realizar una investigación epidemiológica y el genotipado de los aislados en cada caso de sospecha de brote [248, 326]. Peña *et al.*, [327] detectaron un brote inusual de *P. aeruginosa* resistente a carbapenem. La presencia de esta resistencia condujo a una investigación sistemática de los casos apoyada en técnicas moleculares para confirmar la vinculación entre casos e identificar la fuente original del brote.

4.2.1. Descripción del evento

En nuestro estudio, la identificación fenotípica de un número inusual (14 casos en 14 meses) de cepas de *P. aeruginosa*-MDR en una misma planta, fue lo que alertó de la posible emergencia de un brote. La certeza de que una misma cepa es responsable de la transmisión entre los pacientes y de que, por tanto, se trata de un brote real no se puede confirmar hasta la realización de alguna técnica de genotipado molecular.

Los métodos más frecuentes utilizados para el genotipado de *P. aeruginosa* son la tipificación multilocus de secuencias (MLST), el número variable de repeticiones en tándem (VNTR) y la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). El MLST es una técnica simple y es la más ampliamente utilizada, pero es menos discriminativa para brotes que PFGE y VNTR. PFGE es uno de los métodos más discriminativos, pero es bastante laborioso de realizar, lento y, a veces, muy difícil de interpretar. Nosotros aplicamos PFGE como primera aproximación para analizar

la vinculación entre las cepas del potencial brote de nuestro estudio. El resultado mostró que todas las cepas analizadas, sospechosas de formar parte del brote, se agrupaban dentro de un mismo patrón de campos pulsados con ligeras diferencias entre aislados. El objetivo principal del estudio consistía en analizar al mayor nivel de resolución posible este brote emergente, de modo que, se llevó a cabo la WGS de las cepas agrupadas mediante PFGE. La superioridad discriminativa que presenta la WGS con respecto a las técnicas de genotipado convencional se ha estudiado y descrito en muchos artículos aplicado a distintos patógenos en infecciones nosocomiales [197, 269, 328, 329]. Parcell *et al.*, [328] vieron cómo solo la WGS permitió definir con precisión la vinculación de una cepa de *P. aeruginosa* presente en el agua del lavabo con la de 2 pacientes de un brote descartando ambigüedades, lo que condujo a establecer correctamente la relación epidemiológica real entre los aislados implicados. El genotipado mediante VNTR y PFGE únicamente permitió descartar otras fuentes de infección. Por tanto, la WGS es fundamental para definir los brotes, dirigir las intervenciones de prevención e informar sobre la dirección y la secuencia de transmisión [263, 268, 330].

4.2.2. Caracterización genómica del brote

El análisis genómico de nuestro estudio dividió los aislados agrupados por PFGE en cuatro ramas independientes. De los 15 casos involucrados, 9 formaron parte de un grupo mayoritario de cepas que mostraron una vinculación estrecha entre ellas al presentar una distancia genética de 1-11 SNPs y compartir de forma exclusiva 19 SNPs específicos. Adicionalmente se encontraron 2 ramas que conducían a pequeños brotes de cepas MDR, de 2 y 3 miembros, que estaban circulando de forma simultánea en la misma planta, pero que presentaron grandes distancias genéticas con el grupo mayoritario, lo que descarta su clonalidad y, por lo tanto, su vinculación.

Estos resultados denotan la capacidad resolutoria de la secuenciación genómica para caracterizar brotes de *P. aeruginosa*, además, provee información útil para

seguir la evolución de una cepa en comparación a otras técnicas moleculares estándar mencionadas [266, 331, 332]. Sin embargo, todavía la literatura recoge pocos estudios de infección nosocomial por *P. aeruginosa* basados en secuenciación genómica. Se han realizado estudios precisos de cepas endémicas, brotes puntuales y prolongados [266, 268] y los resultados obtenidos han conducido, cada vez más, a integrar la WGS en la vigilancia epidemiológica de las infecciones nosocomiales [330]. En este sentido, Davis *et al.*, [268] describieron el origen de un brote de *P. aeruginosa* en una unidad de neonatos, con la infección de 18 recién nacidos en la sala. Mediante la WGS de 19 aislados (12 clínicos y 7 ambientales) se identificó que una cepa de *P. aeruginosa* ST253 fue la responsable del brote en la unidad de neonatos. Además, se demostró una estrecha relación entre los aislados clínicos y ambientales indicando que los sumideros fueron, potencialmente, la fuente inicial del brote lo que condujo a cambios exhaustivos de limpieza y esterilización en la sala de neonatos para contener la infección.

Cuando realizamos el análisis mediante WGS de nuestro estudio incluimos cepas que presentaban el mismo patrón de sensibilidad a fármacos que la del brote y que habían sido aisladas en la misma planta del hospital, pero en un período de tiempo anterior (2012-2013). La comparación entre cepas nos permitió descubrir que el brote llevaba activo más tiempo del que se había considerado inicialmente y nos condujo a la necesidad de expandir el análisis del brote en el espacio y en el tiempo para estudiarlo en profundidad y definirlo con precisión. El modo más riguroso y preciso de llevar a cabo este objetivo sería mediante WGS, pero su implementación de forma rutinaria en hospitales está lejos todavía de convertirse en una realidad, debido, por una parte, a la necesidad de personal entrenado para su aplicación, análisis e interpretación y, por otro, al costo relativamente elevado que sigue presentando esta tecnología. Por ello, decidimos desarrollar una herramienta sencilla de vigilancia específica de esta cepa, para realizar el análisis masivo de su

transmisión en el hospital y evaluar la factibilidad de su implementación en el ámbito hospitalario.

4.2.3 Abordaje alternativo del estudio del brote

Dada la experiencia acumulada en nuestro grupo del uso de PCRs específicas dirigidas a la identificación de cepas concretas de *Mycobacterium tuberculosis* y al buen resultado obtenido en su aplicación con diferentes objetivos [124, 125, 129, 333], decidimos evaluar si esta estrategia era válida para el estudio y vigilancia de brotes nosocomiales. Tal y como se ha descrito en el epígrafe 2 de esta tesis, la estrategia se basa en la identificación de marcadores específicos de la cepa que se quiere vigilar mediante el uso de WGS. Y, posteriormente, diseñar PCRs alelo específicas que identifiquen la presencia de estos marcadores y, por lo tanto, de la cepa objeto de la vigilancia. De manera que, proponemos una estrategia alternativa, cuya simplicidad, rapidez y bajo costo, la convierten en una herramienta más realista para la aplicación *in situ* en el contexto de un hospital.

La utilización de genotipado dirigido a marcadores específicos de SNPs ha sido evaluado en otros entornos de infección nosocomial por *P. aeruginosa* [249, 334]. Anuj *et al.*, [334] desarrollaron una PCR en tiempo real basada en 10 SNPs específicos para identificar un clon de *P. aeruginosa* perteneciente a uno de los tres clones epidémicos (Australian epidemic strain-1/strain-2 y P42) de *P. aeruginosa* descritos en Australia, proponiendo la PCR como una herramienta alternativa para la vigilancia de cepas problemáticas en ese país.

Para nuestro estudio, desarrollamos una ASO-PCR multiplex específica, dirigida a 5 SNPs, para la identificación de la cepa del brote. Esta PCR se aplicó sobre 290 aislados archivados que incluían cepas de *P. aeruginosa* recopiladas entre los años 2010-2017 y entre las que se incluyeron todas las cepas MDR y XDR, todas las cepas pertenecientes a la planta de onco-hematología y todas aquellas que fueron aisladas de pacientes de trasplante de médula ósea.

Tras su aplicación, identificamos 25 casos no sospechados producidos por la transmisión de esta misma cepa. Se observó que el brote estuvo activo desde el año 2011 hasta el año 2017. Y que en este último año se registró el pico más alto de casos con esta cepa MDR (59% de los casos). Un grupo representativo de 14 aislados analizados por ASO-PCR se secuenciaron con 2 objetivos, por una parte, confirmar el buen funcionamiento de la PCR y, por otro, para la representación gráfica de la distribución de las cepas implicadas en el brote. Los resultados mostraron que efectivamente todos los casos capturados por la PCR presentaban muy pocos SNPs de diferencia con el resto de los casos del brote y que los casos que mostraron un patrón de bandas distinto al de la cepa del brote presentaron distancias genómicas por encima de los 5000 SNPs. También se pudo identificar un caso que se agrupó con uno de los clusters secundarios descritos en el análisis inicial del brote, sugiriendo una posible transmisión activa en la actualidad de este brote secundario.

La distribución topológica de los aislados en el árbol nos permitió identificar el caso índice y descubrir que se trataba de la única cepa capturada en el año 2011. Un barrido exhaustivo de toda la colección archivada de cepas de *P. aeruginosa* del año 2010, nos permitió descartar su presencia en ese año y confirmar el caso índice.

En resumen, la infección nosocomial por *P. aeruginosa* conlleva a un verdadero reto de control hospitalario. La aplicación de la epidemiología genómica sobre aislados sospechosos de ser parte de un brote nosocomial de *P. aeruginosa* XDR nos permitió redefinir el brote con mayor precisión. El análisis genómico descartó casos que habían sido erróneamente asignados al brote por técnicas de genotipado convencional y capturó nuevos casos previamente insospechados. La aplicación de una ASO-PCR específica para esta cepa, demostró que el brote se extendió más allá de lo que se suponía inicialmente. La combinación de los resultados obtenidos de la genómica y la PCR facilitó la identificación precisa del caso índice, nos alertó

sobre la actividad actual del brote y reveló la presencia de 2 eventos de transmisión minoritarios que se superponen con el brote principal.

La nueva estrategia que proponemos para la investigación de brotes nosocomiales ofrece una discriminación y precisión equivalentes a la WGS y es una alternativa útil, sencilla, barata y fácil de interpretar. Su simplicidad y bajo costo permiten i) la actualización masiva de colecciones de forma retrospectiva, ii) la aplicación prospectiva de forma sistemática para controlar nuevos eventos de transmisión, iii) monitorear el éxito de la intervención implementada y iv) extender la vigilancia mediante la inclusión en el análisis de muestras ambientales. En definitiva, esta nueva estrategia integrada de genómica-PCR específica para el monitoreo y el control de brotes, constituye una herramienta innovadora y prometedora para el control y la vigilancia de la infección nosocomial.

Conclusiones

- 1.** La caracterización genotípica mediante MIRU-VNTR de una selección de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* MDR circulantes en Lima, Perú, permitió identificar una alta tasa de transmisión reciente.
- 2.** El estudio integrado de los genotipos de las cepas MDR circulantes en Lima con los obtenidos en Italia y España identificó cepas coincidentes en las tres poblaciones, sugiriendo la existencia de eventos de transmisión intercontinental de Perú a Europa.
- 3.** El análisis detallado por secuenciación de genoma completo de los representantes de una de las cepas MDR compartidas permitió confirmar la exportación independiente de dos variantes circulantes en Lima, una responsable de un brote de gran magnitud en Florencia y otra con una transmisión autolimitada en Milán y Madrid.
- 4.** El análisis genotípico de los aislados de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidos en dos provincias de Panamá identificó las 6 cepas circulantes más abundantes. El estudio genómico de 3 de ellas permitió diferenciar las cepas implicadas en eventos de transmisión reciente, de aquellas con mayor diversidad genética, resultado de su probable persistencia prolongada en la población.
- 5.** La activación en Panamá de una estrategia de vigilancia epidemiológica prospectiva apoyada en tres ASO-PCRs dirigidas a las cepas predominantes, permitió etiquetar a un tercio de las cepas circulantes y reveló una representatividad estable de las cepas mayoritarias. Esta nueva aproximación demostró ser una alternativa eficaz de vigilancia en un entorno sin programas de epidemiología molecular sistemática.

Conclusiones

6. Una de las cepas predominantes en Panamá (cepa A) correspondió al linaje Beijing y se encontró mayoritariamente restringida al entorno de la provincia de Colón, implicando a alrededor de un 50% de los casos incidentes.

7. El estudio comparado de los datos genotípicos y genómicos de la cepa A predominante en Colón, Panamá, indicó que corresponde a una de las ramas modernas del linaje Beijing y sugirió que Vietnam pudo ser el origen de su posible importación a Panamá, dentro del período 2000-2012.

8. La aplicación de una PCR en tiempo real para la identificación de *Mycobacterium chimaera*, basada en el análisis genómico de sus secuencias específicas, permitió optimizar la vigilancia ambiental, directamente sobre las muestras de agua de los dispositivos heater-cooler, y el rastreo sistemático de casos infectados que hubieran pasado desapercibidos. Esta técnica desveló la infección en un paciente que había sido sometido a cirugía cardíaca en una institución diferente a la nuestra.

9. La secuenciación de genoma completo del aislado obtenido del paciente con infección desapercibida por *M. chimaera* y de los obtenidos de los dispositivos contaminados, demostró la implicación de la cepa causante del brote global.

10. La nueva estrategia desarrollada para la vigilancia de la transmisión de tuberculosis, apoyada en secuenciación de genoma completo y desarrollo de ASO-PCRs específicas demostró ser transferible al estudio detallado de un brote nosocomial por *Pseudomonas aeruginosa* XDR.

11. La aplicación del abordaje mencionado permitió redefinir la verdadera magnitud del brote, anteriormente analizado por electroforesis en campos pulsados, descartando casos no relacionados, identificando casos nuevos no sospechados,

revelando la existencia de brotes solapantes adicionales, redefiniendo el verdadero caso índice, y alertando de la continuación de actividad del brote.

Abreviaturas

AAR	acido-alcohol resistente
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNr	ADN ribosómico
AMK	amikacina
ARN	ácido ribonucleico
ASO-PCRs	allele-specific oligonucleotide-PCR
BCG	bacilo de Calmette y Guérin
CAP	capreomicina
CFP	culture filtrate protein
CFUs	unidades formadoras de colonias
DRs	repeticiones directas
E	Etambutol
ECC	Estudio convencional de contacto
ECDC	Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades
ECMO	oxigenación por membrana extracorpórea
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESAT	early secretory antigenic target
FDA	Food and Drug Administration
FQ	fluoroquinolona
H	isoniazida
HCU	Heater-cooler unit
IFN- γ	interferón gamma
IGRA	<i>Interferon-gamma-release assays</i>
ITS	Internal transcribed spacer
KAN	kanamicina
MAC	Complejo <i>Mycobacterium avium</i>
MDR	multirresistente
MGIT	Tubo indicador de crecimiento de Micobacterias
MIRU-VNTR	Unidades Repetitivas Micobacterianas Intercaladas-Número Variable de Repeticiones en Tándem
MLST	secuenciación de múltiples loci
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBC	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NGS	secuenciación de nueva generación
NTM	micobacteria no tuberculosa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAS	acido para-aminosalicílico
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsado

Abreviaturas

PPD	derivado proteico purificado
qPCR	PCR en tiempo real
R	rifampicina
RFLP	polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción
S	estreptomina
SNP	polimorfismos de un único nucleótido
TB	tuberculosis
TB-MDR	TB multirresistente
TB-XDR	TB extensamente resistentes
TNF- α	factor de necrosis tumoral alfa
UCI	unidades de cuidados intensivos
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
VIO	viomicina
WGS	secuenciación de genoma completo
XDR	extensamente resistente
Z	pirazinamida

Referencias

- [1] Sakula A. Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. *Thorax*. 1982;37:246-51.
- [2] Grange JM, Gandy M, Farmer P, Zumla A. Historical declines in tuberculosis: nature, nurture and the biosocial model. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2001;5:208-12.
- [3] Calmette A. Preventive Vaccination Against Tuberculosis with BCG. *Proc R Soc Med*. 1931;24:1481-90.
- [4] Tameris M, Mearns H, Penn-Nicholson A, Gregg Y, Bilek N, Mabwe S, et al. Live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine MTBVAC versus BCG in adults and neonates: a randomised controlled, double-blind dose-escalation trial. *Lancet Respir Med*. 2019;7:757-70.
- [5] Loddenkemper R, Sagebiel D, Brendel A. Strategies against multidrug-resistant tuberculosis. *Eur Respir J Suppl*. 2002;36:66s-77s.
- [6] Murray JF. A century of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:1181-6.
- [7] Frieden TR, Fujiwara PI, Washko RM, Hamburg MA. Tuberculosis in New York City--turning the tide. *N Engl J Med*. 1995;333:229-33.
- [8] Rose AM, Watson JM, Graham C, Nunn AJ, Drobniowski F, Ormerod LP, et al. Tuberculosis at the end of the 20th century in England and Wales: results of a national survey in 1998. *Thorax*. 2001;56:173-9.
- [9] Floyd K, Glaziou P, Houben R, Sumner T, White RG, Raviglione M. Global tuberculosis targets and milestones set for 2016-2035: definition and rationale. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2018;22:723-30.

Referencias

- [10] World Health Organization (WHO). Global tuberculosis report 2019. WHO/CDS/TB/201915.
- [11] MacNeil A, Glaziou P, Sismanidis C, Maloney S, Floyd K. Global Epidemiology of Tuberculosis and Progress Toward Achieving Global Targets - 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2019;68:263-6.
- [12] Gagneux S. Genetic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;374:1-25.
- [13] Galagan JE. Genomic insights into tuberculosis. *Nat Rev Genet.* 2014;15:307-20.
- [14] Mokrousov I. *Mycobacterium tuberculosis* phylogeography in the context of human migration and pathogen's pathobiology: Insights from Beijing and Ural families. *Tuberculosis (Edinb).* 2015;95 Suppl 1:S167-76.
- [15] Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omais B, Marmiesse M, et al. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 2005;1:e5.
- [16] Brites D, Gagneux S. Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens*. *Immunol Rev.* 2015;264:6-24.
- [17] Yin QQ, Liu HC, Jiao WW, Li QJ, Han R, Tian JL, et al. Evolutionary History and Ongoing Transmission of Phylogenetic Sublineages of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Genotype in China. *Sci Rep.* 2016;6:34353.
- [18] Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, van Soolingen D. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis.* 2002;8:843-9.

- [19] Ribeiro SC, Gomes LL, Amaral EP, Andrade MR, Almeida FM, Rezende AL, et al. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. *J Clin Microbiol.* 2014;52:2615-24.
- [20] Iwamoto T, Fujiyama R, Yoshida S, Wada T, Shirai C, Kawakami Y. Population structure dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains during past decades in Japan. *J Clin Microbiol.* 2009;47:3340-3.
- [21] Mokrousov I, Ly HM, Otten T, Lan NN, Vyshnevskiy B, Hoffner S, et al. Origin and primary dispersal of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: clues from human phylogeography. *Genome Res.* 2005;15:1357-64.
- [22] Parwati I, van Crevel R, van Soolingen D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. *Lancet Infect Dis.* 2010;10:103-11.
- [23] Woodman M, Haeusler IL, Grandjean L. Tuberculosis Genetic Epidemiology: A Latin American Perspective. *Genes (Basel).* 2019;10.
- [24] European Concerted Action on New Generation Genetic M, Techniques for the E, Control of T. Beijing/W genotype *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:736-43.
- [25] Fennelly KP, Jones-Lopez EC. Quantity and Quality of Inhaled Dose Predicts Immunopathology in Tuberculosis. *Front Immunol.* 2015;6:313.
- [26] Silva DR, Munoz-Torrico M, Duarte R, Galvao T, Bonini EH, Arbex FF, et al. Risk factors for tuberculosis: diabetes, smoking, alcohol use, and the use of other drugs. *J Bras Pneumol.* 2018;44:145-52.

Referencias

- [27] Dara M, Acosta CD, Melchers NV, Al-Darraji HA, Chorgoliani D, Reyes H, et al. Tuberculosis control in prisons: current situation and research gaps. *Int J Infect Dis.* 2015;32:111-7.
- [28] Long R. Making a timely diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Can Respir J.* 2015;22:317-21.
- [29] Gonzalez-Martin J, Garcia-Garcia JM, Anibarro L, Vidal R, Esteban J, Blanquer R, et al. [Consensus document on the diagnosis, treatment and prevention of tuberculosis]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28:297 e1-20.
- [30] Rajpal S, Dhingra, VK., Aggarwal, J.K. Sputum grading as predictor of treatment outcome in pulmonary tuberculosis. *Ind J Tub.* 2002;49, 139.
- [31] Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, et al. Tuberculosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16076.
- [32] Cardona PJ. Revisiting the natural history of tuberculosis. The inclusion of constant reinfection, host tolerance, and damage-response frameworks leads to a better understanding of latent infection and its evolution towards active disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2010;58:7-14.
- [33] Sia JK, Rengarajan J. Immunology of *Mycobacterium tuberculosis* Infections. *Microbiol Spectr.* 2019;7.
- [34] Cardona PJ, Ivanyi J. The secret trumps, impelling the pathogenicity of tubercle bacilli. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29 Suppl 1:14-9.
- [35] Millet JP, Shaw E, Orcau A, Casals M, Miro JM, Cayla JA, et al. Tuberculosis recurrence after completion treatment in a European city: reinfection or relapse? *PLoS One.* 2013;8:e64898.

- [36] Unis G, Ribeiro AW, Esteves LS, Spies FS, Picon PD, Dalla Costa ER, et al. Tuberculosis recurrence in a high incidence setting for HIV and tuberculosis in Brazil. *BMC Infect Dis*. 2014;14:548.
- [37] Dominguez Del Valle F, Fernandez B, Perez de Las Casas M, Marin B, Bermejo C. [Clinical manifestations and radiology of thoracic tuberculosis]. *An Sist Sanit Navar*. 2007;30 Suppl 2:33-48.
- [38] Lee JY. Diagnosis and treatment of extrapulmonary tuberculosis. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2015;78:47-55.
- [39] Garcia-Rodriguez JF, Alvarez-Diaz H, Lorenzo-Garcia MV, Marino-Callejo A, Fernandez-Rial A, Sesma-Sanchez P. Extrapulmonary tuberculosis: epidemiology and risk factors. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29:502-9.
- [40] Lalvani A, Pareek M. Interferon gamma release assays: principles and practice. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28:245-52.
- [41] Haas MK, Belknap RW. Diagnostic Tests for Latent Tuberculosis Infection. *Clin Chest Med*. 2019;40:829-37.
- [42] Lalvani A, Thillai M. Diagnosis of tuberculosis: principles and practice of using interferon-gamma release assays (IGRAs). *Breathe*. 2009;5:302-9.
- [43] McWilliams T, Wells AU, Harrison AC, Lindstrom S, Cameron RJ, Foskin E. Induced sputum and bronchoscopy in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax*. 2002;57:1010-4.
- [44] Ruiz-Jiménez M, Navarro-Legarda G, Baquero-Artigao F. Utilidad del esputo inducido en el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar infantil. *Anales de Pediatría Continuada*. 2009;7:89-92.

Referencias

[45] Dorronsoro I, Torroba L. [Microbiology of tuberculosis]. An Sist Sanit Navar. 2007;30 Suppl 2:67-85.

[46] Fernández de Vega AF-, Moreno J, González Martín J, J PG. Procedimientos en Microbiología Clínica: MICOBACTERIAS. SEIMC. 2005;9a.

[47] Parrish NM, Carroll KC. Role of the clinical mycobacteriology laboratory in diagnosis and management of tuberculosis in low-prevalence settings. J Clin Microbiol. 2011;49:772-6.

[48] Canetti G, Froman S, Grosset J, Hauduroy P, Langerova M, Mahler HT, et al. Mycobacteria: Laboratory Methods for Testing Drug Sensitivity and Resistance. Bull World Health Organ. 1963;29:565-78.

[49] Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menon NK, Mitchison DA, et al. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. Bull World Health Organ. 1969;41:21-43.

[50] Woods GL, Brown-Elliott BA, Conville PS, Desmond EP, Hall GS, Lin G, et al. In: nd, editor. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes. Wayne (PA)2011.

[51] Bemer P, Bodmer T, Munzinger J, Perrin M, Vincent V, Drugeon H. Multicenter evaluation of the MB/BACT system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2004;42:1030-4.

[52] Bemer P, Palicova F, Rusch-Gerdes S, Drugeon HB, Pfyffer GE. Multicenter evaluation of fully automated BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2002;40:150-4.

- [53] Bergmann JS, Woods GL. In vitro activity of antimicrobial combinations against clinical isolates of susceptible and resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis. 1998;2:621-6.
- [54] Safianowska A, Walkiewicz R, Nejman-Gryz P, Chazan R, Grubek-Jaworska H. [Diagnostic utility of the molecular assay GenoType MTBC (HAIN Lifesciences, Germany) for identification of tuberculous mycobacteria]. Pneumonol Alergol Pol. 2009;77:517-20.
- [55] Richter E, Weizenegger M, Rusch-Gerdes S, Niemann S. Evaluation of genotype MTBC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. J Clin Microbiol. 2003;41:2672-5.
- [56] Richter E, Weizenegger M, Fahr AM, Rusch-Gerdes S. Usefulness of the GenoType MTBC assay for differentiating species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in cultures obtained from clinical specimens. J Clin Microbiol. 2004;42:4303-6.
- [57] Lanzas F, Ioerger TR, Shah H, Acosta W, Karakousis PC. First Evaluation of GenoType MTBDRplus 2.0 Performed Directly on Respiratory Specimens in Central America. J Clin Microbiol. 2016;54:2498-502.
- [58] Theron G, Peter J, Richardson M, Barnard M, Donegan S, Warren R, et al. The diagnostic accuracy of the GenoType((R)) MTBDRsl assay for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs. Cochrane Database Syst Rev. 2014:CD010705.
- [59] Fernández de Vega F. Nuevos métodos de identificación de micobacterias. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2006;24 Supl 1:53-7.

Referencias

- [60] Dobner P, Feldmann K, Rifai M, Loscher T, Rinder H. Rapid identification of mycobacterial species by PCR amplification of hypervariable 16S rRNA gene promoter region. *J Clin Microbiol.* 1996;34:866-9.
- [61] Kim HJ, Mun HS, Kim H, Oh EJ, Ha Y, Bai GH, et al. Differentiation of Mycobacterial species by hsp65 duplex PCR followed by duplex-PCR-based restriction analysis and direct sequencing. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3855-62.
- [62] Choi Y, Hong SR, Jeon BY, Wang HY, Lee GS, Cho SN, et al. Conventional and real-time PCR targeting 16S ribosomal RNA for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2015;19:1102-8, i-ii.
- [63] Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert(R) MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014:CD009593.
- [64] Herrera Martínez T, Arias Muñoz F, Ruiz Lobos N. Manual Operativo. Implementación del GeneXpert MTB/RIF en el Programa de Tuberculosis. 2017:Pág. 1-25.
- [65] Li S, Liu B, Peng M, Chen M, Yin W, Tang H, et al. Diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF for tuberculosis detection in different regions with different endemic burden: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2017;12:e0180725.
- [66] Caminero JA, Cayla JA, Garcia-Garcia JM, Garcia-Perez FJ, Palacios JJ, Ruiz-Manzano J. Diagnosis and Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis. *Arch Bronconeumol.* 2017;53:501-9.
- [67] Gomez-Ayerbe C, Vivancos MJ, Moreno S. [Multidrug-resistant tuberculosis: current epidemiology, therapeutic regimens, new drugs]. *Rev Esp Quimioter.* 2016;29 Suppl 1:35-8.

- [68] McKenna L. Pipeline Report 2019. The Tuberculosis Treatment Pipeline. Treatment Action Group. 2019:Pag. 1-21.
- [69] Conradie F, Diacon AH, Ngubane N, Howell P, Everitt D, Crook AM, et al. Treatment of Highly Drug-Resistant Pulmonary Tuberculosis. *N Engl J Med.* 2020;382:893-902.
- [70] Peña C FV. Avances en el tratamiento de la tuberculosis multirresistente. 2017;Rev Chil Enferm Respir; 33: 137-141.
- [71] Glaziou P, Sismanidis C, Floyd K, Raviglione M. Global epidemiology of tuberculosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;5:a017798.
- [72] Laghari M, Sulaiman SAS, Khan AH, Talpur BA, Bhatti Z, Memon N. Contact screening and risk factors for TB among the household contact of children with active TB: a way to find source case and new TB cases. *BMC Public Health.* 2019;19:1274.
- [73] Reichler MR, Khan A, Sterling TR, Zhao H, Moran J, McAuley J, et al. Risk and Timing of Tuberculosis Among Close Contacts of Persons with Infectious Tuberculosis. *J Infect Dis.* 2018;218:1000-8.
- [74] 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;35:907-14.
- [75] Hermans PW, van Soolingen D, Bik EM, de Haas PE, Dale JW, van Embden JD. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect Immun.* 1991;59:2695-705.

Referencias

[76] García García JM. Estudio de contactos de tuberculosis. *Medicina respiratoria*. 2012;5 (3): 37-47

[77] Infección tuberculosa y estudio de contactos. 2009;D.L.: C 258-2010:Pag.:1-81.

[78] Garcia de Viedma D, Alonso Rodriguez N, Andres S, Ruiz Serrano MJ, Bouza E. Characterization of clonal complexity in tuberculosis by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing. *J Clin Microbiol*. 2005;43:5660-4.

[79] Martin A, Herranz M, Navarro Y, Lasarte S, Ruiz Serrano MJ, Bouza E, et al. Evaluation of the inaccurate assignment of mixed infections by *Mycobacterium tuberculosis* as exogenous reinfection and analysis of the potential role of bacterial factors in reinfection. *J Clin Microbiol*. 2011;49:1331-8.

[80] Kearns AM, Barrett A, Marshall C, Freeman R, Magee JG, Bourke SJ, et al. Epidemiology and molecular typing of an outbreak of tuberculosis in a hostel for homeless men. *J Clin Pathol*. 2000;53:122-4.

[81] Bouklata N, Supply P, Jaouhari S, Charof R, Seghrouchni F, Sadki K, et al. Molecular Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Complex by 24-Locus Based MIRU-VNTR Typing in Conjunction with Spoligotyping to Assess Genetic Diversity of Strains Circulating in Morocco. *PLoS One*. 2015;10:e0135695.

[82] Sola C, Filliol I, Legrand E, Mokrousov I, Rastogi N. *Mycobacterium tuberculosis* phylogeny reconstruction based on combined numerical analysis with IS1081, IS6110, VNTR, and DR-based spoligotyping suggests the existence of two new phylogeographical clades. *J Mol Evol*. 2001;53:680-9.

- [83] Pfyffer GE, Strassle A, van Gorkum T, Portaels F, Rigouts L, Mathieu C, et al. Multidrug-resistant tuberculosis in prison inmates, Azerbaijan. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:855-61.
- [84] Rodriguez NA, Lirola MM, Chaves F, Inigo J, Herranz M, Ritacco V, et al. Differences in the robustness of clusters involving the *Mycobacterium tuberculosis* strains most frequently isolated from immigrant cases in Madrid. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:1544-54.
- [85] Guzman Herrador BR, Ronning K, Borgen K, Mannsaker T, Dahle UR. Description of the largest cluster of tuberculosis notified in Norway 1997-2011: is the Norwegian tuberculosis control programme serving its purpose for high risk groups? *BMC Public Health.* 2015;15:367.
- [86] Fenner L, Gagneux S, Helbling P, Battegay M, Rieder HL, Pfyffer GE, et al. *Mycobacterium tuberculosis* transmission in a country with low tuberculosis incidence: role of immigration and HIV infection. *J Clin Microbiol.* 2012;50:388-95.
- [87] Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Levy-Frebault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol.* 1990;28:2668-73.
- [88] Ei PW, Aung WW, Lee JS, Choi GE, Chang CL. Molecular Strain Typing of *Mycobacterium tuberculosis*: a Review of Frequently Used Methods. *J Korean Med Sci.* 2016;31:1673-83.
- [89] van 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;31:406-9.

Referencias

- [90] Driscoll JR. Spoligotyping for molecular epidemiology of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Methods Mol Biol.* 2009;551:117-28.
- [91] Coll P, Garcia de Viedma D. Molecular epidemiology of tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2018;36:233-40.
- [92] Filliol I, Ferdinand S, Sola C, Thonnon J, Rastogi N. Spoligotyping and IS6110-RFLP typing of *Mycobacterium tuberculosis* from French Guiana: a comparison of results with international databases underlines interregional transmission from neighboring countries. *Res Microbiol.* 2002;153:81-8.
- [93] Tautz D, Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* 1984;12:4127-38.
- [94] Tautz D, Schlotterer. Simple sequences. *Curr Opin Genet Dev.* 1994;4:832-7.
- [95] 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;36:762-71.
- [96] Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2006;44:4498-510.
- [97] Alonso M, Borrell S, Lirola MM, Madrid TBMESGo, Mycobacterium Study Group of B, group I-T, et al. A proposal for applying molecular markers as an aid to identifying potential cases of imported tuberculosis in immigrants. *Tuberculosis (Edinb).* 2008;88:641-7.

- [98] Bidovec-Stojkovic U, Seme K, Zolnir-Dovc M, Supply P. Prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* from fresh clinical samples. PLoS One. 2014;9:e109547.
- [99] de Beer JL, van Ingen J, de Vries G, Erkens C, Sebek M, Mulder A, et al. Comparative study of IS6110 restriction fragment length polymorphism and variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the Netherlands, based on a 5-year nationwide survey. J Clin Microbiol. 2013;51:1193-8.
- [100] Jonsson J, Hoffner S, Berggren I, Bruchfeld J, Ghebremichael S, Pennhag A, et al. Comparison between RFLP and MIRU-VNTR genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Stockholm 2009 to 2011. PLoS One. 2014;9:e95159.
- [101] Guthrie JL, Marchand-Austin A, Cronin K, Lam K, Pyskir D, Kong C, et al. Universal genotyping reveals province-level differences in the molecular epidemiology of tuberculosis. PLoS One. 2019;14:e0214870.
- [102] Garcia De Viedma D, Perez-Lago L. The Evolution of Genotyping Strategies To Detect, Analyze, and Control Transmission of Tuberculosis. Microbiol Spectr. 2018;6.
- [103] Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 1998;393:537-44.
- [104] Niemann S, Koser 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;4:e7407.

Referencias

[105] Schurch AC, Kremer K, Daviena O, Kiers A, Boeree MJ, Siezen RJ, et al. High-resolution typing by integration of genome sequencing data in a large tuberculosis cluster. *J Clin Microbiol*. 2010;48:3403-6.

[106] Gardy JL, Johnston JC, Ho Sui SJ, Cook VJ, Shah L, Brodtkin E, et al. Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak. *N Engl J Med*. 2011;364:730-9.

[107] Walker TM, Ip CL, 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;13:137-46.

[108] 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;4:e7815.

[109] Reyes JF, Chan CH, Tanaka MM. Impact of homoplasy on variable numbers of tandem repeats and spoligotypes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Genet Evol*. 2012;12:811-8.

[110] Bryant JM, Schurch AC, van Deutekom H, Harris SR, de Beer JL, de Jager V, et al. Inferring patient to patient transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from whole genome sequencing data. *BMC Infect Dis*. 2013;13:110.

[111] Hatherell HA, Colijn C, Stagg HR, Jackson C, Winter JR, Abubakar I. Interpreting whole genome sequencing for investigating tuberculosis transmission: a systematic review. *BMC Med*. 2016;14:21.

[112] Eldholm V, Monteserin J, Rieux A, Lopez B, Sobkowiak B, Ritacco V, et al. Four decades of transmission of a multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* outbreak strain. *Nat Commun*. 2015;6:7119.

- [113] Stucki D, Ballif M, Egger M, Furrer H, Altpeter E, Battegay M, et al. Standard Genotyping Overestimates Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* among Immigrants in a Low-Incidence Country. *J Clin Microbiol.* 2016;54:1862-70.
- [114] Folkvardsen DB, Norman A, Andersen AB, Michael Rasmussen E, Jelsbak L, Lillebaek T. Genomic Epidemiology of a Major *Mycobacterium tuberculosis* Outbreak: Retrospective Cohort Study in a Low-Incidence Setting Using Sparse Time-Series Sampling. *J Infect Dis.* 2017;216:366-74.
- [115] Abascal E, Perez-Lago L, Martinez-Lirola M, Chiner-Oms A, Herranz M, Chaoui I, et al. Whole genome sequencing-based analysis of tuberculosis (TB) in migrants: rapid tools for cross-border surveillance and to distinguish between recent transmission in the host country and new importations. *Euro Surveill.* 2019;24.
- [116] Acosta F, Agapito J, Cabibbe AM, Caceres T, Sola C, Perez-Lago L, et al. Exportation of MDR TB to Europe from Setting with Actively Transmitted Persistent Strains in Peru. *Emerg Infect Dis.* 2019;25:596-8.
- [117] Walker TM, Merker M, Knoblauch AM, Helbling P, Schoch OD, van der Werf MJ, et al. A cluster of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among patients arriving in Europe from the Horn of Africa: a molecular epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2018;18:431-40.
- [118] Zignol M, Cabibbe AM, Dean AS, Glaziou P, Alikhanova N, Ama C, et al. Genetic sequencing for surveillance of drug resistance in tuberculosis in highly endemic countries: a multi-country population-based surveillance study. *The Lancet Infectious Diseases.* 2018;18:675-83.

Referencias

- [119] Tagliani E, Cirillo DM, Ködmön C, van der Werf MJ, Anthony R, van Soolingen D, et al. EUSeqMyTB to set standards and build capacity for whole genome sequencing for tuberculosis in the EU. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018;18:377.
- [120] Casali N, Broda A, Harris SR, Parkhill J, Brown T, Drobniowski F. Whole Genome Sequence Analysis of a Large Isoniazid-Resistant Tuberculosis Outbreak in London: A Retrospective Observational Study. *PLoS Med*. 2016;13:e1002137.
- [121] Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M, et al. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nat Genet*. 2013;45:1176-82.
- [122] Perez-Lago L, Comas I, Navarro Y, Gonzalez-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;209:98-108.
- [123] Perez-Lago L, Herranz M, Comas I, Ruiz-Serrano MJ, Lopez Roa P, Bouza E, et al. Ultrafast Assessment of the Presence of a High-Risk *Mycobacterium tuberculosis* Strain in a Population. *J Clin Microbiol*. 2016;54:779-81.
- [124] Perez-Lago L, Izco S, Herranz M, Tudo G, Carcelen M, Comas I, et al. A novel strategy based on genomics and specific PCR reveals how a multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain became prevalent in Equatorial Guinea 15 years after its emergence. *Clin Microbiol Infect*. 2017;23:92-7.
- [125] Perez-Lago L, Martinez-Lirola M, Garcia S, Herranz M, Mokrousov I, Comas I, et al. Urgent Implementation in a Hospital Setting of a Strategy To Rule Out Secondary Cases Caused by Imported Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains at Diagnosis. *J Clin Microbiol*. 2016;54:2969-74.

- [126] Abascal E, Herrera DM, Herranz M, Santanton S, Martinez-Lirola M, Tudo G, et al. A deletion hampering appropriate typing of *Mycobacterium africanum*. Tuberculosis (Edinb). 2017;103:24-7.
- [127] Perez-Lago L, Campos-Herrero MI, Canas F, Copado R, Sante L, Pino B, et al. A *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain persists at high rates and extends its geographic boundaries 20 years after importation. Sci Rep. 2019;9:4687.
- [128] Monteserin J, Perez-Lago L, Yokobori N, Paul R, Rodriguez Maus S, Simboli N, et al. Trends of Two Epidemic Multidrug-Resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Argentina Disclosed by Tailored Molecular Strategy. Am J Trop Med Hyg. 2019;101:1308-11.
- [129] Perez-Lago L, Martinez Lirola M, Herranz M, Comas I, Bouza E, Garcia-de-Viedma D. Fast and low-cost decentralized surveillance of transmission of tuberculosis based on strain-specific PCRs tailored from whole genome sequencing data: a pilot study. Clin Microbiol Infect. 2015;21:249 e1-9.
- [130] Murray M. Determinants of cluster distribution in the molecular epidemiology of tuberculosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:1538-43.
- [131] Love J, Sonnenberg P, Glynn JR, Gibson A, Gopaul K, Fang Z, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in England, 1998. Int J Tuberc Lung Dis. 2009;13:201-7.
- [132] Oliveira O, Gaio R, Carvalho C, Correia-Neves M, Duarte R, Rito T. A nationwide study of multidrug-resistant tuberculosis in Portugal 2014-2017 using epidemiological and molecular clustering analyses. BMC Infect Dis. 2019;19:567.

Referencias

- [133] Sandgren A, Schepisi MS, Sotgiu G, Huitric E, Migliori GB, Manissero D, et al. Tuberculosis transmission between foreign- and native-born populations in the EU/EEA: a systematic review. *Eur Respir J*. 2014;43:1159-71.
- [134] van Soolingen D, Borgdorff MW, de Haas PE, Sebek MM, Veen J, Dessens M, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997. *J Infect Dis*. 1999;180:726-36.
- [135] Burgos M, DeRiemer K, Small PM, Hopewell PC, Daley CL. Effect of drug resistance on the generation of secondary cases of tuberculosis. *J Infect Dis*. 2003;188:1878-84.
- [136] Garcia-Garcia ML, Ponce de Leon A, Jimenez-Corona ME, Jimenez-Corona A, Palacios-Martinez M, Balandrano-Campos S, et al. Clinical consequences and transmissibility of drug-resistant tuberculosis in southern Mexico. *Arch Intern Med*. 2000;160:630-6.
- [137] Godfrey-Faussett P, Sonnenberg P, Shearer SC, Bruce MC, Mee C, Morris L, et al. Tuberculosis control and molecular epidemiology in a South African gold-mining community. *The Lancet*. 2000;356:1066-71.
- [138] 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*. 2011;44:106-10.
- [139] Stefan MA, Ugur FS, Garcia GA. Source of the Fitness Defect in Rifamycin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* RNA Polymerase and the Mechanism of Compensation by Mutations in the beta' Subunit. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62.

- [140] Kruuner A, Hoffner SE, Sillastu H, Danilovits M, Levina K, Svenson SB, et al. Spread of drug-resistant pulmonary tuberculosis in Estonia. *J Clin Microbiol.* 2001;39:3339-45.
- [141] Gandhi NR, Weissman D, Moodley P, Ramathal M, Elson I, Kreiswirth BN, et al. Nosocomial transmission of extensively drug-resistant tuberculosis in a rural hospital in South Africa. *J Infect Dis.* 2013;207:9-17.
- [142] Ritacco V, Lopez B, Ambroggi M, Palmero D, Salvadores B, Gravina E, et al. HIV infection and geographically bound transmission of drug-resistant tuberculosis, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:1802-10.
- [143] Perdigao J, Macedo R, Joao I, Fernandes E, Brum L, Portugal I. Multidrug-resistant tuberculosis in Lisbon, Portugal: a molecular epidemiological perspective. *Microb Drug Resist.* 2008;14:133-43.
- [144] Merker M, Nikolaevskaya E, Kohl TA, Molina-Moya B, Pavlovskaya O, Brannberg P, et al. Multidrug- and Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Clades, Ukraine, 2015. *Emerg Infect Dis.* 2020;26:481-90.
- [145] Merker M, Blin C, Mona S, Duforet-Freboung N, Lecher S, Willery E, et al. Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. *Nat Genet.* 2015;47:242-9.
- [146] Allix-Beguec C, Wahl C, Hanekom M, Nikolayevskyy V, Drobniowski 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;52:164-72.
- [147] Black AT, Hamblion EL, Buttivant H, Anderson SR, Stone M, Casali N, et al. Tracking and responding to an outbreak of tuberculosis using MIRU-VNTR

Referencias

genotyping and whole genome sequencing as epidemiological tools. *J Public Health (Oxf)*. 2018;40:e66-e73.

[148] Katale BZ, Mbebele PM, Lema NA, Campino S, Mshana SE, Rweyemamu MM, et al. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates and clinical outcomes of patients treated for multidrug-resistant tuberculosis in Tanzania. *BMC Genomics*. 2020;21:174.

[149] Jajou R, Kohl TA, Walker T, Norman A, Cirillo DM, Tagliani E, et al. Towards standardisation: comparison of five whole genome sequencing (WGS) analysis pipelines for detection of epidemiologically linked tuberculosis cases. *Euro Surveill*. 2019;24.

[150] Bauer J, Thomsen VO, Poulsen S, Andersen AB. False-positive results from cultures of *Mycobacterium tuberculosis* due to laboratory cross-contamination confirmed by restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol*. 1997;35:988-91.

[151] Ruddy M, McHugh TD, Dale JW, Banerjee D, Maguire H, Wilson P, et al. Estimation of the rate of unrecognized cross-contamination with *Mycobacterium tuberculosis* in London microbiology laboratories. *J Clin Microbiol*. 2002;40:4100-4.

[152] Jasmer RM, Roemer M, Hamilton J, Bunter J, Braden CR, Shinnick TM, et al. A prospective, multicenter study of laboratory cross-contamination of *Mycobacterium tuberculosis* cultures. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:1260-3.

[153] Yan JJ, Jou R, Ko WC, Wu JJ, Yang ML, Chen HM. The use of variable-number tandem-repeat mycobacterial interspersed repetitive unit typing to identify laboratory cross-contamination with *Mycobacterium tuberculosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005;52:21-8.

- [154] Sisilema-Egas F, Ruiz-Serrano MJ, Bouza E, Garcia-de-Viedma D. Qualitative Analysis To Ascertain Genotypic Identity of or Differences between *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Laboratories with Limited Resources. J Clin Microbiol. 2013;51:4230-3.
- [155] Northrup JM, Miller AC, Nardell E, Sharnprapai S, Etkind S, Driscoll J, et al. Estimated costs of false laboratory diagnoses of tuberculosis in three patients. Emerg Infect Dis. 2002;8:1264-70.
- [156] de Boer AS, Blommerde B, de Haas PE, Sebek MM, Lambregts-van Weezenbeek KS, Dessens M, et al. False-positive *Mycobacterium tuberculosis* cultures in 44 laboratories in The Netherlands (1993 to 2000): incidence, risk factors, and consequences. J Clin Microbiol. 2002;40:4004-9.
- [157] Chang CL, Kim HH, Son HC, Park SS, Lee MK, Park SK, et al. False-positive growth of *Mycobacterium tuberculosis* attributable to laboratory contamination confirmed by restriction fragment length polymorphism analysis. Int J Tuberc Lung Dis. 2001;5:861-7.
- [158] Alonso M, Herranz M, Martinez Lirola M, Group I-T, Gonzalez-Rivera M, Bouza E, et al. Real-time molecular epidemiology of tuberculosis by direct genotyping of smear-positive clinical specimens. J Clin Microbiol. 2012;50:1755-7.
- [159] Verver S, Warren RM, Beyers N, Richardson M, van der Spuy GD, Borgdorff MW, et al. Rate of reinfection tuberculosis after successful treatment is higher than rate of new tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med. 2005;171:1430-5.
- [160] Bang D, Andersen AB, Thomsen VO, Lillebaek T. Recurrent tuberculosis in Denmark: relapse vs. re-infection. Int J Tuberc Lung Dis. 2010;14:447-53.

Referencias

- [161] Kruuner A, Pehme L, Ghebremichael S, Koivula T, Hoffner SE, Mikelsaar M. Use of molecular techniques to distinguish between treatment failure and exogenous reinfection with *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Infect Dis. 2002;35:146-55.
- [162] Wang JY, Lee LN, Lai HC, Hsu HL, Liaw YS, Hsueh PR, et al. Prediction of the tuberculosis reinfection proportion from the local incidence. J Infect Dis. 2007;196:281-8.
- [163] Dobler CC, Crawford AB, Jelfs PJ, Gilbert GL, Marks GB. Recurrence of tuberculosis in a low-incidence setting. Eur Respir J. 2009;33:160-7.
- [164] Afshar B, Carless J, Roche A, Balasegaram S, Anderson C. Surveillance of tuberculosis (TB) cases attributable to relapse or reinfection in London, 2002-2015. PLoS One. 2019;14:e0211972.
- [165] Merker M, Kohl TA, Roetzer A, Truebe L, Richter E, Rusch-Gerdes S, et al. Whole genome sequencing reveals complex evolution patterns of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains in patients. PLoS One. 2013;8:e82551.
- [166] CDC/NHSN Surveillance Definition of Healthcare-Associated Infection and Criteria for Specific Types of Infections in the Acute Care Setting. CDC. 2013;17:1-58.
- [167] Allegranzi B, Nejad SB, Combescure C, Graafmans W, Attar H, Donaldson L, et al. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. The Lancet. 2011;377:228-41.
- [168] World Health Organization (WHO). Report on the Burden of Endemic Health Care-Associated Infection Worldwide. 2011;ISBN 978 92 4 150150 7.

[169] Organización Panamericana de la Salud (OPS). Directrices sobre componentes básicos para los programas de prevención y control de infecciones a nivel nacional y de establecimientos de atención de salud para pacientes agudos. 2017;ISBN: 978-92-75-31963-5.

[170] Bouza E, Alonso S, Asensio A, De Juan G, Garcia Lucio C, Larrosa C, et al. Information on nosocomial infections in the mainstream media: an opinion document. *Rev Esp Quimioter.* 2019;32:165-77.

[171] ESTUDIO EPINE-EPPS 2017. Según el protocolo "EPINE-Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in acute care hospitals, ECDC, 2016-2017". 2017;Estudio EPINE nº 28: 1990-2017.

[172] Mayon-White RT, Ducel G, Kereselidze T, Tikomirov E. An international survey of the prevalence of hospital-acquired infection. *J Hosp Infect.* 1988;11 Suppl A:43-8.

[173] Coello R, Glenister H, Fereres J, Bartlett C, Leigh D, Sedgwick J, et al. The cost of infection in surgical patients: a case-control study. *J Hosp Infect.* 1993;25:239-50.

[174] Cosgrove SE. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clin Infect Dis.* 2006;42 Suppl 2:S82-9.

[175] Kilgore ML, Ghosh K, Beavers CM, Wong DY, Hymel PA, Jr., Brossette SE. The costs of nosocomial infections. *Med Care.* 2008;46:101-4.

[176] Olaechea PM, Insausti J, Blanco A, Luque P. [Epidemiology and impact of nosocomial infections]. *Med Intensiva.* 2010;34:256-67.

Referencias

- [177] Haque M, Sartelli M, McKimm J, Abu Bakar M. Health care-associated infections - an overview. *Infect Drug Resist.* 2018;11:2321-33.
- [178] Amazian K, Rossello J, Castella A, Sekkat S, Terzaki S, Dhidah L, et al. [Prevalence of nosocomial infections in 27 hospitals in the Mediterranean region]. *East Mediterr Health J.* 2010;16:1070-8.
- [179] Gastmeier P, Stamm-Balderjahn S, Hansen S, Nitzschke-Tiemann F, Zuschneid I, Groneberg K, et al. How outbreaks can contribute to prevention of nosocomial infection: analysis of 1,022 outbreaks. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2005;26:357-61.
- [180] He M, Miyajima F, Roberts P, Ellison L, Pickard DJ, Martin MJ, et al. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. *Nat Genet.* 2013;45:109-13.
- [181] Jenkins DR. Nosocomial infections and infection control. *Medicine.* 2017;45:629-33.
- [182] Daneman N, Green KA, Low DE, Simor AE, Willey B, Schwartz B, et al. Surveillance for hospital outbreaks of invasive group a streptococcal infections in Ontario, Canada, 1992 to 2000. *Ann Intern Med.* 2007;147:234-41.
- [183] Chang HL, Tang CH, Hsu YM, Wan L, Chang YF, Lin CT, et al. Nosocomial outbreak of infection with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a medical center in Taiwan. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009;30:34-8.
- [184] van der Kooi TI, Mannien J, Wille JC, van Benthem BH. Prevalence of nosocomial infections in The Netherlands, 2007-2008: results of the first four national studies. *J Hosp Infect.* 2010;75:168-72.

- [185] El-Ageery SM, Abo-Shadi MA, Alghaithy AA, Ahmad MA, Alsharif NH, Alharbi SA. Epidemiological investigation of nosocomial infection with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012;16:1834-9.
- [186] Tortoli E, Rindi L, Garcia MJ, Chiaradonna P, Dei R, Garzelli C, et al. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54:1277-85.
- [187] Wallace RJ, Iakhiaeva E, Williams MD, Brown-Elliott BA, Vasireddy S, Vasireddy R, et al. Absence of *Mycobacterium intracellulare* and Presence of *Mycobacterium chimaera* in Household Water and Biofilm Samples of Patients in the United States with *Mycobacterium avium* Complex Respiratory Disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51:1747-52.
- [188] Kuehl R, Banderet F, Egli A, Keller PM, Frei R, Dobelet T, et al. Different Types of Heater-Cooler Units and Their Risk of Transmission of *Mycobacterium chimaera* During Open-Heart Surgery: Clues From Device Design. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2018;39:834-40.
- [189] Shafizadeh N, Hale G, Bhatnagar J, Alshak NS, Nomura J. *Mycobacterium chimaera* Hepatitis: A New Disease Entity. *Am J Surg Pathol*. 2019;43:244-50.
- [190] Larcher R, Lounnas M, Dumont Y, Michon AL, Bonzon L, Chiron R, et al. *Mycobacterium chimaera* Pulmonary Disease in Cystic Fibrosis Patients, France, 2010-2017. *Emerg Infect Dis*. 2019;25:611-3.
- [191] Hasse B, Hannan MM, Keller PM, Maurer FP, Sommerstein R, Mertz D, et al. International Society of Cardiovascular Infectious Diseases Guidelines for the Diagnosis, Treatment and Prevention of Disseminated *Mycobacterium chimaera*

Referencias

Infection Following Cardiac Surgery with Cardiopulmonary Bypass. *J Hosp Infect.* 2020;104:214-35.

[192] Scriven JE, Scobie A, Verlander NQ, Houston A, Collyns T, Cajic V, et al. *Mycobacterium chimaera* infection following cardiac surgery in the United Kingdom: clinical features and outcome of the first 30 cases. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24:1164-70.

[193] Achermann Y, Rossle M, Hoffmann M, Deggim V, Kuster S, Zimmermann DR, et al. Prosthetic valve endocarditis and bloodstream infection due to *Mycobacterium chimaera*. *J Clin Microbiol.* 2013;51:1769-73.

[194] Campins Marti M, Borrás Bermejo B, Armadans Gil L. Infections with *Mycobacterium chimaera* and open chest surgery. An unresolved problem. *Med Clin (Barc).* 2019;152:317-23.

[195] Lyman MM, Grigg C, Kinsey CB, Keckler MS, Moulton-Meissner H, Cooper E, et al. Invasive Nontuberculous Mycobacterial Infections among Cardiothoracic Surgical Patients Exposed to Heater-Cooler Devices(1). *Emerg Infect Dis.* 2017;23:796-805.

[196] Sax H, Bloemberg G, Hasse B, Sommerstein R, Kohler P, Achermann Y, et al. Prolonged Outbreak of *Mycobacterium chimaera* Infection After Open-Chest Heart Surgery. *Clin Infect Dis.* 2015;61:67-75.

[197] Hasan NA, Epperson LE, Lawsin A, Rodger RR, Perkins KM, Halpin AL, et al. Genomic Analysis of Cardiac Surgery-Associated *Mycobacterium chimaera* Infections, United States. *Emerg Infect Dis.* 2019;25:559-63.

[198] Gilbert JA. Nosocomial nontuberculous mycobacteria infections associated with heater-cooler devices. *The Lancet Respiratory Medicine.* 2017;5:384.

- [199] Schreiber PW, Kuster SP, Hasse B, Bayard C, Ruegg C, Kohler P, et al. Reemergence of *Mycobacterium chimaera* in Heater-Cooler Units despite Intensified Cleaning and Disinfection Protocol. *Emerg Infect Dis.* 2016;22:1830-3.
- [200] van Ingen J, Kohl TA, Kranzer K, Hasse B, Keller PM, Katarzyna Szafrńska A, et al. Global outbreak of severe *Mycobacterium chimaera* disease after cardiac surgery: a molecular epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases.* 2017;17:1033-41.
- [201] Riccardi N, Monticelli J, Antonello RM, Luzzati R, Gabrielli M, Ferrarese M, et al. *Mycobacterium chimaera* infections: An update. *J Infect Chemother.* 2020;26:199-205.
- [202] Schreiber PW, Hasse B, Sax H. *Mycobacterium chimaera* infections after cardiac surgery-lessons learned. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24:1117-8.
- [203] Hamad R, Noly PE, Perrault LP, Pellerin M, Demers P. *Mycobacterium chimaera* Infection After Cardiac Surgery: First Canadian Outbreak. *Ann Thorac Surg.* 2017;104:e43-e5.
- [204] Trudzinski FC, Schlotthauer U, Kamp A, Hennemann K, Muellenbach RM, Reischl U, et al. Clinical implications of *Mycobacterium chimaera* detection in thermoregulatory devices used for extracorporeal membrane oxygenation (ECMO), Germany, 2015 to 2016. *Euro Surveill.* 2016;21.
- [205] Sommerstein R, Ruegg C, Kohler P, Bloemberg G, Kuster SP, Sax H. Transmission of *Mycobacterium chimaera* from Heater-Cooler Units during Cardiac Surgery despite an Ultraclean Air Ventilation System. *Emerg Infect Dis.* 2016;22:1008-13.

Referencias

[206] Percival SL, Suleman L, Vuotto C, Donelli G. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *J Med Microbiol.* 2015;64:323-34.

[207] Nielsen C, Winther CL, Thomsen PK, Andreasen JJ. Elimination of *Mycobacterium chimaera* in a heater cooler device used during on-pump cardiothoracic surgery. *Perfusion.* 2017;32:507-10.

[208] Nikolayevskyy V, Maurer FP, Holicka Y, Taylor L, Liddy H, Kranzer K. Novel external quality assurance scheme for drug susceptibility testing of non-tuberculous mycobacteria: a multicentre pilot study. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74:1288-94.

[209] Zozaya-Valdes E, Porter JL, Coventry J, Fyfe JAM, Carter GP, Goncalves da Silva A, et al. Target-Specific Assay for Rapid and Quantitative Detection of *Mycobacterium chimaera* DNA. *J Clin Microbiol.* 2017;55:1847-56.

[210] Zhang X, Lin J, Feng Y, Wang X, McNally A, Zong Z. Identification of *Mycobacterium chimaera* in heater-cooler units in China. *Sci Rep.* 2018;8:7843.

[211] Robinson JO, Coombs GW, Speers DJ, Keehner T, Keil AD, D'Abrera V, et al. *Mycobacterium chimaera* colonisation of heater-cooler units (HCU) in Western Australia, 2015: investigation of possible iatrogenic infection using whole genome sequencing. *Euro Surveill.* 2016;21.

[212] Allen KB, Yuh DD, Schwartz SB, Lange RA, Hopkins R, Bauer K, et al. Nontuberculous *Mycobacterium* Infections Associated With Heater-Cooler Devices. *Ann Thorac Surg.* 2017;104:1237-42.

[213] Madhusudhan NS, Malini A, Sangma MM. A Case of Surgical Site Infection Caused by *Mycobacterium fortuitum*, following Herniorrhaphy. *J Clin Diagn Res.* 2016;10:DD01-DD2.

- [214] Sommerstein R, Hasse B, Marschall J, Sax H, Genoni M, Schlegel M, et al. Global Health Estimate of Invasive *Mycobacterium chimaera* Infections Associated with Heater-Cooler Devices in Cardiac Surgery. *Emerg Infect Dis*. 2018;24:576-8.
- [215] Chand M, Lamagni T, Kranzer K, Hedge J, Moore G, Parks S, et al. Insidious Risk of Severe *Mycobacterium chimaera* Infection in Cardiac Surgery Patients. *Clin Infect Dis*. 2017;64:335-42.
- [216] Jarashow MC, Terashita D, Balter S, Schwartz B. Notes from the Field: *Mycobacteria chimaera* Infections Associated with Heater-Cooler Unit Use During Cardiopulmonary Bypass Surgery - Los Angeles County, 2012-2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2019;67:1428-9.
- [217] Kohler P, Kuster SP, Bloemberg G, Schulthess B, Frank M, Tanner FC, et al. Healthcare-associated prosthetic heart valve, aortic vascular graft, and disseminated *Mycobacterium chimaera* infections subsequent to open heart surgery. *Eur Heart J*. 2015;36:2745-53.
- [218] Zweifel SA, Mihic-Probst D, Curcio CA, Barthelmes D, Thielken A, Keller PM, et al. Clinical and Histopathologic Ocular Findings in Disseminated *Mycobacterium chimaera* Infection after Cardiothoracic Surgery. *Ophthalmology*. 2017;124:178-88.
- [219] Tan N, Sampath R, Abu Saleh OM, Tweet MS, Jevremovic D, Alniemi S, et al. Disseminated *Mycobacterium chimaera* Infection After Cardiothoracic Surgery. *Open Forum Infect Dis*. 2016;3:ofw131.
- [220] Ogunremi T, Taylor G, Johnston L, Amaratunga K, Muller M, Coady A, et al. *Mycobacterium chimaera* infections in post-operative patients exposed to heater-cooler devices: An overview. *Canada Communicable Disease Report*. 2017;43:107-13.

Referencias

[221] Foroutan F, Guyatt GH, O'Brien K, Bain E, Stein M, Bhagra S, et al. Prognosis after surgical replacement with a bioprosthetic aortic valve in patients with severe symptomatic aortic stenosis: systematic review of observational studies. *BMJ*. 2016;354:i5065.

[222] McNeely CA, Vassileva CM. Long-term outcomes of mitral valve repair versus replacement for degenerative disease: a systematic review. *Curr Cardiol Rev*. 2015;11:157-62.

[223] Silby MW, Winstanley C, Godfrey SAC, Levy SB, Jackson RW. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*. 2011;35:652-80.

[224] Estepa V, Rojo-Bezarez B, Torres C, Saenz Y. Faecal carriage of *Pseudomonas aeruginosa* in healthy humans: antimicrobial susceptibility and global genetic lineages. *FEMS Microbiol Ecol*. 2014;89:15-9.

[225] Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22:582-610.

[226] Oliver A, Alarcón T, Caballero E, Cantón R. Diagnóstico microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2009;27:89-104.

[227] Gaynes R, Edwards JR, National Nosocomial Infections Surveillance S. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis*. 2005;41:848-54.

[228] Valentini M, Gonzalez D, Mavridou DA, Filloux A. Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Opin Microbiol*. 2018;41:15-20.

- [229] Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:39.
- [230] Cantón R, Fernández Olmos A, de la Pedrosa EGG, Del Campo R, Antonia Meseguer M. Infección bronquial crónica: el problema de *Pseudomonas aeruginosa*. *Archivos de Bronconeumología.* 2011;47:8-13.
- [231] Zoumot Z, Wilson R. Respiratory infection in noncystic fibrosis bronchiectasis. *Curr Opin Infect Dis.* 2010;23:165-70.
- [232] Lambert PA. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med.* 2002;95 Suppl 41:22-6.
- [233] Bajpai V, Govindaswamy A, Khurana S, Batra P, Aravinda A, Katoch O, et al. Phenotypic & genotypic profile of antimicrobial resistance in *Pseudomonas* species in hospitalized patients. *Indian J Med Res.* 2019;149:216-21.
- [234] Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, Jung R. Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. *Pharmacotherapy.* 2005;25:1353-64.
- [235] Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:268-81.
- [236] Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, Jung R. National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care unit patients from 1993 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:4606-10.

Referencias

[237] Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, Kaufmann ME, Turton J, Glover J, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. J Clin Microbiol. 2004;42:5094-101.

[238] Vitkauskienė A SA, Dambrauskienė A, Bakšytė G, Macas, A, Sakalauskas R,. Characteristics of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains in Patients with Ventilator-Associated Pneumonia in Intensive Care Units. Medicina (Kaunas). 2011;47(12):652-6.

[239] Klockgether J, Cramer N, Wiehlmann L, Davenport CF, Tummler B. *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. Front Microbiol. 2011;2:150.

[240] Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. BMC Infect Dis. 2006;6:130.

[241] Clifton IJ, Peckham DG. Defining routes of airborne transmission of *Pseudomonas aeruginosa* in people with cystic fibrosis. Expert Rev Respir Med. 2010;4:519-29.

[242] Knibbs LD, Johnson GR, Kidd TJ, Cheney J, Grimwood K, Kattenbelt JA, et al. Viability of *Pseudomonas aeruginosa* in cough aerosols generated by persons with cystic fibrosis. Thorax. 2014;69:740-5.

[243] Sudharsanam S, Mathias S, Ethiraj M, Sarangan G, Barani R, Swaminathan S, et al. Airborne *Pseudomonas* species in Healthcare Facilities in a Tropical Setting. Curr Health Sci J. 2015;41:95-103.

- [244] Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med*. 2014;370:1198-208.
- [245] Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, James D, Kearns A, Woodford N. Pathogens of skin and skin-structure infections in the UK and their susceptibility to antibiotics, including ceftaroline. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70:2844-53.
- [246] Wang J, Liu F, Tartari E, Huang J, Harbarth S, Pittet D, et al. The Prevalence of Healthcare-Associated Infections in Mainland China: A Systematic Review and Meta-analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2018;39:701-9.
- [247] Gomez Gomez J, Alcantara Villar M, Simarro Cordoba E, Martinez Vicente B, Ruiz Gomez J, Guerra Perez B, et al. [*P. aeruginosa* bacteremias: analysis of prognostic factors. A prospective study, 1992-1998]. *Rev Clin Esp*. 2004;204:452-6.
- [248] Estaji M, Tabasi M, Sadeghpour Heravi F, Kheirvari Khezerloo J, Radmanesh A, Raheb J, et al. Genotypic identification of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with urinary tract infection. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2019;65:23-8.
- [249] Syrmis MW, Kidd TJ, Moser RJ, Ramsay KA, Gibson KM, Anuj S, et al. A comparison of two informative SNP-based strategies for typing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *BMC Infect Dis*. 2014;14:307.
- [250] Kaufmann ME. Pulsed-field gel electrophoresis. *Methods Mol Med*. 1998;15:33-50.
- [251] Chen JW, Lau YY, Krishnan T, Chan KG, Chang CY. Recent Advances in Molecular Diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* Infection by State-of-the-Art Genotyping Techniques. *Front Microbiol*. 2018;9:1104.

Referencias

- [252] Johnson JK, Smith G, Lee MS, Venezia RA, Stine OC, Nataro JP, et al. The role of patient-to-patient transmission in the acquisition of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization in the intensive care unit. *J Infect Dis.* 2009;200:900-5.
- [253] Vu-Thien H, Corbineau G, Hormigos K, Fauroux B, Corvol H, Clement A, et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for longitudinal survey of sources of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 2007;45:3175-83.
- [254] Onteniente L, Brisse S, Tassios PT, Vergnaud G. Evaluation of the polymorphisms associated with tandem repeats for *Pseudomonas aeruginosa* strain typing. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4991-7.
- [255] Shokoohizadeh L, Alizade H, rajabi RA, Namordizadeh V, Karmostaji A. Tandem repeat analysis for typing of *Pseudomonas aeruginosa* carrying resistance genes in southern Iran. *Reviews in Medical Microbiology.* 2020;31:92-8.
- [256] Nadon CA, Trees E, Ng LK, Moller Nielsen E, Reimer A, Maxwell N, et al. Development and application of MLVA methods as a tool for inter-laboratory surveillance. *Euro Surveill.* 2013;18:20565.
- [257] Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sa-Leao R, van Dijk J, Laurent F, et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill.* 2013;18:20380.
- [258] Wendt M, Heo GJ. Multilocus sequence typing analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from pet Chinese stripe-necked turtles (*Ocadia sinensis*). *Lab Anim Res.* 2016;32:208-16.

[259] Perez-Losada M, Arenas M, Castro-Nallar E. Microbial sequence typing in the genomic era. *Infect Genet Evol.* 2018;63:346-59.

[260] Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5644-9.

[261] Maiden MCJ, van Rensburg MJJ, Bray JE, Earle SG, Ford SA, Jolley KA, et al. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nature Reviews Microbiology.* 2013;11:728-36.

[262] Le VT, Diep BA. Selected insights from application of whole-genome sequencing for outbreak investigations. *Curr Opin Crit Care.* 2013;19:432-9.

[263] Quick J, Cumley N, Wearn CM, Niebel M, Constantinidou C, Thomas CM, et al. Seeking the source of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a recently opened hospital: an observational study using whole-genome sequencing. *BMJ Open.* 2014;4:e006278.

[264] Perdigao J, Modesto A, Pereira AL, Neto O, Matos V, Godinho A, et al. Whole-genome sequencing resolves a polyclonal outbreak by extended-spectrum beta-lactam and carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a Portuguese tertiary-care hospital. *Microb Genom.* 2020.

[265] Eisenberger D, Tuschak C, Werner M, Bogdan C, Bollinger T, Hossain H, et al. Whole-genome analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks suggests the occurrence of few endemic clonal lineages in Bavaria, Germany. *J Antimicrob Chemother.* 2020.

[266] Buhl M, Kästle C, Geyer A, Autenrieth IB, Peter S, Willmann M. Molecular Evolution of Extensively Drug-Resistant (XDR) *Pseudomonas aeruginosa* Strains

Referencias

From Patients and Hospital Environment in a Prolonged Outbreak. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10.

[267] Ramanathan B, Jindal HM, Le CF, Gudimella R, Anwar A, Razali R, et al. Next generation sequencing reveals the antibiotic resistant variants in the genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*. 2017;12:e0182524.

[268] Davis RJ, Jensen SO, Van Hal S, Espedido B, Gordon A, Farhat R, et al. Whole Genome Sequencing in Real-Time Investigation and Management of a *Pseudomonas aeruginosa* Outbreak on a Neonatal Intensive Care Unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2015;36:1058-64.

[269] Quainoo S, Coolen JPM, van Hijum S, Huynen MA, Melchers WJG, van Schaik W, et al. Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens: the Future of Nosocomial Outbreak Analysis. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30:1015-63.

[270] Oakeson KF, Wagner JM, Mendenhall M, Rohrwasser A, Atkinson-Dunn R. Bioinformatic Analyses of Whole-Genome Sequence Data in a Public Health Laboratory. *Emerg Infect Dis*. 2017;23:1441-5.

[271] Bauer J, Andersen AB, Kremer K, Miorner H. Usefulness of spoligotyping To discriminate IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark. *J Clin Microbiol*. 1999;37:2602-6.

[272] Ruddy MC. Outbreak of isoniazid resistant tuberculosis in north London. *Thorax*. 2004;59:279-85.

[273] Shea J, Halse TA, Lapierre P, Shudt M, Kohlerschmidt D, Van Roey P, et al. Comprehensive Whole-Genome Sequencing and Reporting of Drug Resistance Profiles on Clinical Cases of *Mycobacterium tuberculosis* in New York State. *J Clin Microbiol*. 2017;55:1871-82.

[274] Herranz M, Pole I, Ozere I, Chiner-Oms A, Martinez-Lirola M, Perez-Garcia F, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Acquires Limited Genetic Diversity in Prolonged Infections, Reactivations and Transmissions Involving Multiple Hosts. *Front Microbiol.* 2017;8:2661.

[275] Cowger TL, Wortham JM, Burton DC. Epidemiology of tuberculosis among children and adolescents in the USA, 2007–17: an analysis of national surveillance data. *The Lancet Public Health.* 2019;4:e506-e16.

[276] Zammarchi L, Tortoli E, Borroni E, Bartalesi F, Strohmeyer M, Baretta S, et al. High prevalence of clustered tuberculosis cases in peruvian migrants in florence, Italy. *Infect Dis Rep.* 2014;6:5646.

[277] Dhawan V, Bown J, Lau A, Langlois-Klassen D, Kunimoto D, Bhargava R, et al. Towards the elimination of paediatric tuberculosis in high-income, immigrant-receiving countries: a 25-year conventional and molecular epidemiological case study. *ERJ Open Res.* 2018;4.

[278] Greenwood MJ, Warriner WR. Immigrants and the Spread of Tuberculosis in the United States: A Hidden Cost of Immigration. *Population Research and Policy Review.* 2011;30:839-59.

[279] Barletta F, Otero L, de Jong BC, Iwamoto T, Arikawa K, Van der Stuyft P, et al. Predominant *Mycobacterium tuberculosis* Families and High Rates of Recent Transmission among New Cases Are Not Associated with Primary Multidrug Resistance in Lima, Peru. *J Clin Microbiol.* 2015;53:1854-63.

[280] Hamblion EL, Le Menach A, Anderson LF, Lalor MK, Brown T, Abubakar I, et al. Recent TB transmission, clustering and predictors of large clusters in London,

Referencias

2010-2012: results from first 3 years of universal MIRU-VNTR strain typing. *Thorax*. 2016;71:749-56.

[281] Xu G, Mao X, Wang J, Pan H. Clustering and recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in a Chinese population. *Infect Drug Resist*. 2018;11:323-30.

[282] Borrell S, Gagneux S. Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009;13:1456-66.

[283] Borgdorff MW, van den Hof S, Kalisvaart N, Kremer K, van Soolingen D. Influence of sampling on clustering and associations with risk factors in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Am J Epidemiol*. 2011;174:243-51.

[284] Fiebig L, Kohl TA, Popovici O, Muhlenfeld M, Indra A, Homorodean D, et al. A joint cross-border investigation of a cluster of multidrug-resistant tuberculosis in Austria, Romania and Germany in 2014 using classic, genotyping and whole genome sequencing methods: lessons learnt. *Euro Surveill*. 2017;22.

[285] Hargreaves S, Lonroth K, Nellums LB, Olaru ID, Nathavitharana RR, Norredam M, et al. Multidrug-resistant tuberculosis and migration to Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2017;23:141-6.

[286] White Z, Painter J, Douglas P, Abubakar I, Njoo H, Archibald C, et al. Immigrant Arrival and Tuberculosis among Large Immigrant- and Refugee-Receiving Countries, 2005-2009. *Tuberc Res Treat*. 2017;2017:8567893.

[287] INDICADORES BÁSICOS DE PAÍSES. Ministerio de Salud (MINSAs), Panamá. Informe. 2017.

- [288] Rosas S, Bravo J, Gonzalez F, de Moreno N, Sanchez J, Gavilan RG, et al. High clustering rates of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in Panama. BMC Infect Dis. 2013;13:442.
- [289] Sambrano D, Correa R, Almengor P, Dominguez A, Vega S, Goodridge A. *Mycobacterium tuberculosis* isolates from single outpatient clinic in Panama City exhibit wide genetic diversity. Am J Trop Med Hyg. 2014;91:310-2.
- [290] Lanzas F, Karakousis PC, Sacchetti JC, Ioerger TR. Multidrug-resistant tuberculosis in Panama is driven by clonal expansion of a multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain related to the KZN extensively drug-resistant *M. tuberculosis* strain from South Africa. J Clin Microbiol. 2013;51:3277-85.
- [291] Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, Rodriguez JC, Garcia I, Cabrera P, et al. Epidemiological evidence of the spread of a *Mycobacterium tuberculosis* strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island. Am J Respir Crit Care Med. 2001;164:1165-70.
- [292] Martinez-Lirola M, Alonso-Rodriguez N, Sanchez ML, Herranz M, Andres S, Penafiel T, et al. Advanced survey of tuberculosis transmission in a complex socioepidemiologic scenario with a high proportion of cases in immigrants. Clin Infect Dis. 2008;47:8-14.
- [293] Alonso-Rodriguez N, Martinez-Lirola M, Sanchez ML, Herranz M, Penafiel T, Bonillo Mdel C, et al. Prospective universal application of mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat genotyping to characterize *Mycobacterium tuberculosis* isolates for fast identification of clustered and orphan cases. J Clin Microbiol. 2009;47:2026-32.

Referencias

[294] Lucerna MA, Rodriguez-Contreras R, Barroso P, Martinez MJ, Sanchez-Benitez ML, Garcia de Viedma D, et al. [Molecular epidemiology of tuberculosis in Almeria (Spain). Factors associated with recent transmission]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29:174-8.

[295] Aze J, Sola C, Zhang J, Lafosse-Marin F, Yasmin M, Siddiqui R, et al. Genomics and Machine Learning for Taxonomy Consensus: The *Mycobacterium tuberculosis* Complex Paradigm. *PLoS One*. 2015;10:e0130912.

[296] Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, Kreiswirth BN. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol*. 2002;10:45-52.

[297] Yang C, Luo T, Sun G, Qiao K, Sun G, DeRiemer K, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains favor transmission but not drug resistance in China. *Clin Infect Dis*. 2012;55:1179-87.

[298] Iwamoto T, Grandjean L, Arikawa K, Nakanishi N, Caviedes L, Coronel J, et al. Genetic diversity and transmission characteristics of Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru. *PLoS One*. 2012;7:e49651.

[299] Mokrousov I, Vyazovaya A, Otten T, Zhuravlev V, Pavlova E, Tarashkevich L, et al. *Mycobacterium tuberculosis* population in northwestern Russia: an update from Russian-EU/Latvian border region. *PLoS One*. 2012;7:e41318.

[300] Plan Estratégico Nacional para el Control de la Tuberculosis en Panamá 2018–2022. Information at the Gaceta Oficial of Panama. <https://www.gacetaoficial.gob.pa/pdfTemp/28549/67983.pdf>. 2018.

- [301] Lisdawati V, Puspadari N, Rif'ati L, Soekarno T, M M, K S, et al. Molecular epidemiology study of *Mycobacterium tuberculosis* and its susceptibility to anti-tuberculosis drugs in Indonesia. *BMC Infect Dis.* 2015;15:366.
- [302] Holt KE, McAdam P, Thai PVK, Thuong NTT, Ha DTM, Lan NN, et al. Frequent transmission of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage and positive selection for the EsxW Beijing variant in Vietnam. *Nat Genet.* 2018;50:849-56.
- [303] Liu Y, Zhang X, Zhang Y, Sun Y, Yao C, Wang W, et al. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains in Beijing, China: drug susceptibility phenotypes and Beijing genotype family transmission. *BMC Infect Dis.* 2018;18:658.
- [304] Tuite AR, Guthrie JL, Alexander DC, Whelan MS, Lee B, Lam K, et al. Epidemiological evaluation of spatiotemporal and genotypic clustering of *Mycobacterium tuberculosis* in Ontario, Canada. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2013;17:1322-7.
- [305] Samper S, Iglesias MJ, Rabanaque MJ, Lezcano MA, Vitoria LA, Rubio MC, et al. The molecular epidemiology of tuberculosis in Zaragoza, Spain: a retrospective epidemiological study in 1993. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998;2:281-7.
- [306] Lopez-Calleja AI, Lezcano MA, Vitoria MA, Iglesias MJ, Cebollada A, Lafoz C, et al. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* over two periods: a changing scenario for tuberculosis transmission. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007;11:1080-6.
- [307] Millan-Lou MI, Lopez-Calleja AI, Colmenarejo C, Lezcano MA, Vitoria MA, del Portillo P, et al. Global study of IS6110 in a successful *Mycobacterium tuberculosis* strain: clues for deciphering its behavior and for its rapid detection. *J Clin Microbiol.* 2013;51:3631-7.

Referencias

- [308] Lillebaek T, Dirksen A, Kok-Jensen A, Andersen AB. A dominant *Mycobacterium tuberculosis* strain emerging in Denmark. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2004;8:1001-6.
- [309] Lillebaek T, Andersen AB, Rasmussen EM, Kamper-Jorgensen Z, Pedersen MK, Bjorn-Mortensen K, et al. *Mycobacterium tuberculosis* outbreak strain of Danish origin spreading at worrying rates among greenland-born persons in Denmark and Greenland. *J Clin Microbiol*. 2013;51:4040-4.
- [310] Kamper-Jorgensen Z, Andersen AB, Kok-Jensen A, Bygbjerg IC, Andersen PH, Thomsen VO, et al. Clustered tuberculosis in a low-burden country: nationwide genotyping through 15 years. *J Clin Microbiol*. 2012;50:2660-7.
- [311] Luo T, Comas I, Luo D, Lu B, Wu J, Wei L, et al. Southern East Asian origin and coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family with Han Chinese. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:8136-41.
- [312] Shitikov E, Kolchenko S, Mokrousov I, Bespyatykh J, Ischenko D, Ilina E, et al. Evolutionary pathway analysis and unified classification of East Asian lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep*. 2017;7:9227.
- [313] Mestre O, Luo T, Dos Vultos T, Kremer K, Murray A, Namouchi A, et al. Phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains constructed from polymorphisms in genes involved in DNA replication, recombination and repair. *PLoS One*. 2011;6:e16020.
- [314] Ritacco V, Lopez B, Cafrune PI, Ferrazoli L, Suffys PN, Candia N, et al. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype are rarely observed in tuberculosis patients in South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103:489-92.

- [315] Rutaihwa LK, Menardo F, Stucki D, Gygli SM, Ley SD, Malla B, et al. Multiple Introductions of *Mycobacterium tuberculosis* Lineage 2–Beijing Into Africa Over Centuries. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 2019;7.
- [316] Eldholm V, Pettersson JH, Brynildsrud OB, Kitchen A, Rasmussen EM, Lillebaek T, et al. Armed conflict and population displacement as drivers of the evolution and dispersal of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:13881-6.
- [317] Ford CB, Shah RR, Maeda MK, Gagneux S, Murray MB, Cohen T, et al. *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. *Nat Genet*. 2013;45:784-90.
- [318] Mehaffy C, Guthrie JL, Alexander DC, Stuart R, Rea E, Jamieson FB. Marked microevolution of a unique *Mycobacterium tuberculosis* strain in 17 years of ongoing transmission in a high risk population. *PLoS One*. 2014;9:e112928.
- [319] Stucki D, Ballif M, Bodmer T, Coscolla M, Maurer AM, 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;211:1306-16.
- [320] Danna DM. Hospital Costs Associated with Sepsis Compared with Other Medical Conditions. *Crit Care Nurs Clin North Am*. 2018;30:389-98.
- [321] Meije Y, Gasch O, Espasa M, Jiménez M, Sierra M, Calsina M, et al. Brote de endocarditis por *M. chimaera* en Barcelona. *Cirugía Cardiovascular*. 2018;25:62-3.
- [322] Zegri-Reiriz I, Cobo-Marcos M, Rodriguez-Alfonso B, Millan R, Dominguez F, Forteza A, et al. Successful treatment of healthcare-associated *Mycobacterium*

Referencias

chimaera prosthetic infective endocarditis: the first Spanish case report. Eur Heart J Case Rep. 2018;2:yty142.

[323] Mok S, Rogers TR, Fitzgibbon M. Evaluation of GenoType NTM-DR Assay for Identification of *Mycobacterium chimaera*. J Clin Microbiol. 2017;55:1821-6.

[324] van Kleef E, Gasparrini A, Guy R, Cookson B, Hope R, Jit M, et al. Nosocomial transmission of *C. difficile* in English hospitals from patients with symptomatic infection. PLoS One. 2014;9:e99860.

[325] Juan Nicolau C, Oliver A. [Carbapenemases in *Pseudomonas spp*]. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;28 Suppl 1:19-28.

[326] Hota S, Hirji Z, Stockton K, Lemieux C, Dedier H, Wolfaardt G, et al. Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection secondary to imperfect intensive care unit room design. Infect Control Hosp Epidemiol. 2009;30:25-33.

[327] Pena C, Dominguez MA, Pujol M, Verdaguer R, Gudiol F, Ariza J. An outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a urology ward. Clin Microbiol Infect. 2003;9:938-43.

[328] Parcell BJ, Oravcova K, Pinheiro M, Holden MTG, Phillips G, Turton JF, et al. *Pseudomonas aeruginosa* intensive care unit outbreak: winnowing of transmissions with molecular and genomic typing. J Hosp Infect. 2018;98:282-8.

[329] Eyre DW, Cule ML, Wilson DJ, Griffiths D, Vaughan A, O'Connor L, et al. Diverse sources of *C. difficile* infection identified on whole-genome sequencing. N Engl J Med. 2013;369:1195-205.

- [330] Ward DV, Hoss AG, Kolde R, van Aggelen HC, Loving J, Smith SA, et al. Integration of genomic and clinical data augments surveillance of healthcare-acquired infections. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2019;40:649-55.
- [331] Witney AA, Gould KA, Pope CF, Bolt F, Stoker NG, Cubbon MD, et al. Genome sequencing and characterization of an extensively drug-resistant sequence type 111 serotype O12 hospital outbreak strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20:O609-18.
- [332] Snyder LA, Loman NJ, Faraj LA, Levi K, Weinstock G, Boswell TC, et al. Epidemiological investigation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a six-year-long hospital outbreak using high-throughput whole genome sequencing. *Euro Surveill*. 2013;18.
- [333] Dominguez J, Acosta F, Perez-Lago L, Sambrano D, Batista V, De La Guardia C, et al. Simplified Model to Survey Tuberculosis Transmission in Countries Without Systematic Molecular Epidemiology Programs. *Emerg Infect Dis*. 2019;25:507-14.
- [334] Anuj SN, Wwhiley DM, Kidd TJ, Ramsay KA, Bell SC, Syrmis MW, et al. Rapid single-nucleotide polymorphism-based identification of clonal *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis by the use of real-time PCR and high-resolution melting curve analysis. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:1403-8.

Referencias
