

VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

FACULTAT DE FARMÀCIA



**EVOLUCIÓN DE LA TUBERCULOSIS
EN LA PROVINCIA DE CASTELLÓN (2008-2012).
CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA
MEDIANTE 15 MIRU-VNTR**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

BÁRBARA GOMILA SARD

Dirigida por:

Dr. FERNANDO GONZÁLEZ CANDELAS

Dra. ROSARIO MORENO MUÑOZ

Dr. IÑAKI COMAS ESPADAS

Valencia, 2015

*UNIVERSITAT
DE
VALÈNCIA*



*FACULTAT
DE
FARMÀCIA*

TESIS DOCTORAL

DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I ECOLOGIA
FACULTAT DE FARMÀCIA, UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**EVOLUCIÓN DE LA TUBERCULOSIS
EN LA PROVINCIA DE CASTELLÓN (2008-2012).
CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA
MEDIANTE 15 MIRU-VNTR**

por

BÁRBARA GOMILA SARD

Directores

Dr. FERNANDO GONZÁLEZ CANDELAS

Catedrático de Genética

Departament de Genètica, Universitat de València

Dra. ROSARIO MORENO MUÑOZ

Jefa de Servicio de Microbiología

Hospital General Universitario de Castellón

Dr. IÑAKI COMAS ESPADAS

Investigador

FISABIO – Salud Pública de Valencia

Valencia, 2015



DEPARTAMENT DE
MICROBIOLOGIA I ECOLOGIA

Los abajo firmantes **Dr. FERNANDO GONZÁLEZ CANDELAS**, Catedrático de Genética de la Universidad de Valencia, **Dra. ROSARIO MORENO MUÑOZ**, Jefa de Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Castellón, y el **Dr. IÑAKI COMAS ESPADAS**, Investigador de FISABIO de Salud Pública de Valencia, por la presente:

CERTIFICAN: Que Dña. **BÁRBARA GOMILA SARD** ha realizado la Tesis Doctoral titulada "EVOLUCIÓN DE LA TUBERCULOSIS EN LA PROVINCIA DE CASTELLÓN (2008-2012). CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA MEDIANTE 15 MIRU-VNTR" en FISABIO de Salud Pública de Valencia, actuando como Tutor el **Dr. SALVADOR MORMENEO BERNAT**, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universitat de València, con el fin de optar al Grado de Doctor en Farmacia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente en Valencia, a 19 de Octubre de 2015.

Fdo: Dr. F. González

Fdo.: Dra. R. Moreno

Fdo.: Dr. I. Comas

A mis padres

A Guillermo

A mis dos soles

GOMILA SARD, BÁRBARA 2015.- "EVOLUCIÓN DE LA TUBERCULOSIS EN LA PROVINCIA DE CASTELLÓN (2008-2012). CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA MEDIANTE 15 MIRU-VNTR". TESIS DOCTORAL (DIRS. DR. F. GONZÁLEZ CANDELAS, DRA. R. MORENO MUÑOZ Y DR. I. COMAS ESPADAS), FACULTAT DE FARMÀCIA, UNIVERSITAT DE VALÈNCIA, VALÈNCIA, 151 pp.

*La tuberculosis (TB) es considerada una de las primeras enfermedades infecciosas humanas de las que se tiene constancia y aún hoy, en pleno siglo XXI, es una de las más importantes causantes de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Según describe la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su 19º informe, 9 millones de personas enfermaron de TB a nivel mundial en el año 2013, aunque en éste se refiere que ha habido una disminución de casos en los últimos años. También el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) y el Centro Nacional de Epidemiología (CNE) informan que en Europa y en España, en el año 2012, el número de casos de TB disminuyó respecto al año anterior. La presente Tesis Doctoral tiene como objetivos conocer la evolución de la TB en la provincia de Castellón a lo largo del periodo comprendido entre enero de 2008 a diciembre de 2012, describir las características clínico-epidemiológicas y microbiológicas de los casos diagnosticados con cultivo positivo, detallar la frecuencia de resistencias de *Mycobacterium tuberculosis* frente a fármacos tuberculostáticos de primera línea, y analizar los patrones de transmisión de TB en Castellón durante los años 2010, 2011 y 2012 mediante tipificación molecular, utilizando la técnica 15 MIRU-VNTR. Para conseguir los 3 primeros objetivos consultamos varias fuentes de información como son el Sistema de Información del Laboratorio (SIL), el Sistema del Análisis de la Vigilancia Epidemiológica (AVE) y los informes de TB editados por la Generalitat Valenciana. Para llevar a cabo el cuarto objetivo, analizamos las cepas congeladas y recuperadas de los tres años indicados mediante la técnica de epidemiología molecular 15 MIRU-VNTR. En la provincia de Castellón se declararon 387 casos de TB, de los que 320 (82,7%) tuvieron el cultivo positivo; en 2008 se diagnosticaron microbiológicamente 74 casos, 83 en el 2009, 66 en el 2010, 56 en el 2011 y 41 en el 2012. En cuanto a las características de los pacientes, la razón hombre/mujer fue de 1,9 y la edad media fue de 32,5 años, concentrándose el 60,6% en el grupo de adultos jóvenes (15-44 años). El 43,7% de los pacientes eran extranjeros, el 93,8% fueron casos no tratados previamente, el 29,4% presentaba al menos un factor de riesgo para desarrollar enfermedad tuberculosa y, por último, el 67,2% de los pacientes fueron hospitalizados. Respecto a las formas clínicas, un 87,2% fueron TB pulmonar, predominando la ganglionar entre las formas extrapulmonares. A partir del estudio convencional de contactos se sospechó 7 posibles brotes de 2 miembros. El estudio de sensibilidad se realizó a las 320 cepas aisladas, resultando resistentes el 13,5%, siendo la resistencia a isoniazida del 8,1%. En población de origen español el porcentaje de resistencias fue del 10,6% mientras que en extranjeros fue del 15,7%. Se realizó la tipificación molecular a 151 cepas de las 163 aisladas en los tres años. Los loci más polimórficos fueron el VNTR 4052, el VNTR 2163b y el VNTR 3690, y los que presentaron un poder de discriminación elevado, calculado a partir del índice de diversidad de Hunter-Gaston, fueron los MIRU 26, 40 y 10, y los VNTR 577, 2401, 3690, 2163b, 1955 y 4052. Evidenciamos que 122 cepas presentaron un patrón único y que 29 cepas se agruparon en 12 clusters, siendo el porcentaje de agrupación del 19,2% y la tasa de transmisión reciente de un 11,3%. En el presente estudio se concluye que la tasa de TB, y paralelamente el número de casos con cultivo positivo, en la provincia de Castellón ha disminuido a lo largo de los años analizados; que el fenómeno de la inmigración tiene una influencia importante en la TB de nuestra provincia; que el número de hospitalizaciones, aún siendo menor que en estudios previos, sigue siendo elevado y que la resistencia global de un 13,5% es también más elevada a la descrita en trabajos anteriores en Castellón. De estas resistencias, la de isoniazida superior al 5% obliga a tratar la TB en los dos primeros meses con asociación de 4 fármacos, como recomienda la OMS; el porcentaje elevado de resistencia a isoniazida en el año 2010 fue debido a un brote que fue confirmado con tipificación molecular. Aplicando la técnica 15 MIRU-VNTR, con un índice de discriminación elevado de 0,998, se ha detectado una baja tasa de transmisión durante los 3 años analizados.*

PALABRAS CLAVE: Tuberculosis, Resistencia, Epidemiología molecular, MIRU-VNTR, Transmisión.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer es lo mínimo que se me ocurre una vez terminada esta Tesis. Ha supuesto un esfuerzo tan grande que resulta poco probable que lo pueda realizar una persona sola; en mi caso, hubiera sido imposible por muchas razones. Por todo ello, me gustaría no olvidarme de todas aquellas personas que directamente, o indirectamente, han ayudado a que este trabajo haya pasado de un simple proyecto a una realidad.

Mi agradecimiento más sincero a mi directora la Dra. Rosario Moreno Muñoz, Jefa de Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Castellón, por transmitirme su entusiasmo y amor por la Microbiología, y por su herencia, "el mundo de las micobacterias". Quiero agradecer, también, sus innumerables horas de trabajo dedicadas a esta tesis y por ponerle tanta pasión e ilusión. Gracias por la sabiduría de tus consejos y la orientación durante el desarrollo de este trabajo. Nunca podré olvidar tu gran apoyo y tus muestras de cariño en mis momentos difíciles, antes y durante la elaboración de este proyecto. Gracias Maro por estar siempre ahí; te quiero muchísimo.

A mis otros directores, el Dr. Fernando González Candelas, Catedrático de Genética de la Universitat de València, y el Dr. Iñaki Comas Espadas, Investigador del FISABIO de Salud Pública de Valencia, por confiar en mí desde el principio, por facilitarme toda la infraestructura necesaria para la Tesis, y por ayudarme a llevar a cabo este proyecto. Gracias por la paciencia que tuvisteis en momentos personales delicados en los que parecía que el final de este proyecto no iba a tener lugar. Fue un verdadero placer trabajar con vosotros.

A mis compañeras, y amigas, Susana, María y Lola, por todos esos preciosos años compartidos, haciéndoos partícipes, en este último periodo, de mi trabajo y mis agobios. Gracias, sobre todo, por esos momentos de risas y complicidad que hemos pasado juntas. Especialmente a ti Lola, agradecer tus valiosas sugerencias en esta Tesis.

A todos los restantes miembros del Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Castellón, por su ayuda en mi trabajo y por hacerme sentir, siempre, tan querida y como en casa. Todo mi cariño para vosotros. A Victoria, agradecerle sus consejos y aportaciones que tanto me han ayudado.

A Luis y a Amparo. No sabría cómo daros las gracias de verdad por toda la ayuda y dedicación prestada en la parte experimental de este trabajo. Nunca olvidaré, Luis, tus frases llenas de optimismo y tus palabras de ánimo en mis momentos de desesperación. Gracias a esta Tesis he conocido a una persona tan genial como tú.

A Carla, Profesora Titular de Parasitología de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València y amiga, porque no dudó en prestarme su ayuda en la maquetación de la Tesis. Gracias a ti, el trabajo tiene una presentación adecuada.

A D. Francisco González Morán, Jefe de Servicio de la Vigilancia Epidemiológica de la Dirección General de Salud Pública (Comunidad Valenciana), por facilitarme todos los datos recogidos a partir de las encuestas epidemiológicas de la tuberculosis, por su accesibilidad y por su ayuda en las dudas que me surgieron.

A la Dra. Margarita Marín Royo, del Servicio de Neumología del Hospital General Universitario de Castellón, agradecerle su amistad y colaboración en todo lo relacionado con la tuberculosis. Gracias por transmitirme, junto a mi Jefa de Servicio, ese entusiasmo y dedicación en conocer, cada vez mejor, esta enfermedad.

A mis padres, Toni y Margarita, por confiar ciegamente en mí, por esas palabras de ánimo y de apoyo incondicional. Gracias por vuestro amor y esfuerzo; sin él, yo no estaría donde estoy. Para vosotros, todo mi amor.

A mis dos hermanas, Cati y Marga, quería expresarles que el convencimiento que tenéis vosotras de que vuestra hermana mayor puede con todo, me ha hecho, en muchas ocasiones, llenarme de fuerza y seguir adelante.

A Guillermo, porque sin su apoyo no hubiese sido posible la realización de este trabajo; por estar siempre a mi lado, por entender tan bien esta etapa y por sustituirme en mis ausencias con los peques y hacer que todo sea más fácil. Gracias porque a pesar de ese momento tan delicado que vivimos, me animaste a seguir y a terminar la Tesis; sobre todo, gracias cariño por quererme tanto. Y a mis hijos, Rosa y a Guille, por haberos quitado ese maravilloso tiempo, pero que a partir de ahora, os devolveré.

No quiero acabar este apartado sin mencionar a uno de mis grandes tesoros, mis amigas. A todas, y cada una de vosotras, mil gracias por estar siempre ahí, por entender este periodo y por hacer de "mamis", en ocasiones, de mis hijos. Siento no haberos podido dedicar esos ratitos tan valiosos que casi siempre hemos tenido pero que volveremos a tener dentro de muy poquito.

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Reseña histórica de la tuberculosis	3
1.2.- Aspectos epidemiológicos	6
1.2.1.- Situación de la tuberculosis en el Mundo.....	6
1.2.2.- Situación de la tuberculosis en Europa	8
1.2.3.- Situación de la tuberculosis en España y en la Comunidad Valenciana	10
1.2.3.1.- En España	10
1.2.3.2.- En la Comunidad Valenciana	11
1.3.- Etiología, patogenia y transmisión de la tuberculosis	12
1.3.1.- Etiología y patogenia	12
1.3.2.- Transmisión.....	13
1.3.3.- Estudio convencional de contactos.....	14
1.4.- Epidemiología molecular de la tuberculosis	18
1.4.1.- Descripción.....	18
1.4.2.- Técnicas.....	20
1.4.2.1.- Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de la secuencia de inserción IS6110 (RFLP-IS6110)	21
1.4.2.2.- Espoligotipado (“Spoligotyping”).....	23
1.4.2.3.- MIRU-VNTR (<i>Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Numbers of Tandem Repeat</i>)	24
1.4.2.4.- Otras técnicas de tipificación molecular	27
1.4.3.- Utilidad de las técnicas de epidemiología molecular	29
1.4.3.1.- En el conocimiento de la transmisión de la enfermedad.....	29
A) <i>Transmisión reciente de la tuberculosis</i>	29

<i>B) Reinfeción exógena e infecciones mixtas</i>	<i>31</i>
<i>C) Transmisión de cepas resistentes</i>	<i>31</i>
<i>D) Transmisión de cepas más virulentas</i>	<i>32</i>
1.4.3.2.- En el estudio de contactos y en los programas de control de la TB ...	33
1.4.3.3.- En la caracterización de contaminaciones cruzadas en el laboratorio.	34
2.- OBJETIVOS	37
3.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
3.1.- El Hospital General Universitario de Castellón	43
3.2.- Fuentes de información	43
3.2.1.- Sistema de Información del Laboratorio	43
3.2.2.- Sistema de Análisis de la Vigilancia Epidemiológica	44
3.2.3.- Informes de Tuberculosis de la Comunidad Valenciana.....	44
3.3.- Diagnóstico microbiológico y estudio de sensibilidad.....	45
3.3.1.- Diagnóstico microbiológico.....	45
3.3.1.1.- Procesamiento primario	45
3.3.1.2.- Cultivo y baciloscopia	46
3.3.1.3.- Identificación de las cepas.....	47
3.3.1.4.- Diagnóstico mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa	47
3.3.2.- Estudio de sensibilidad	48
3.4.- Mantenimiento de los aislados y recuperación.....	49
3.4.1.- Mantenimiento de los aislados.....	49
3.4.2.- Recuperación de las cepas	49
3.5.- Tipificación molecular de los aislados.....	50
3.5.1.- Extracción del ADN.....	50
3.5.2.- Análisis de la calidad del ADN.....	50

3.5.3.- Amplificación mediante PCR de 15 loci MIRU	50
3.5.3.1.- Amplificación mediante PCR multiplex	52
3.5.3.2.- Amplificación mediante PCR individuales	54
3.5.3.3.- Medición del producto amplificado tras PCR multiplex	55
3.5.4.- Secuenciación mediante electroforesis capilar	56
3.5.4.1.- Preparación de la placa para el secuenciador	56
3.5.4.2.- Análisis de los productos obtenidos	57
3.5.5.- Electroforesis en gel de agarosa	57
3.5.5.1.- Análisis de los tamaños obtenidos	58
3.5.6.- Análisis de los genotipos obtenidos.....	59
3.4.6.1.- Genotipos.....	59
3.4.6.2.- Tasa de transmisión	59
3.4.6.3.- Poder de discriminación de la técnica.....	59
4.- RESULTADOS.....	61
4.1.- Resultados obtenidos a partir de las fuentes de información.....	63
4.2.- Resultados sobre el diagnóstico microbiológico	68
4.2.1.- Resultado de la baciloscopia.....	68
4.2.2.- Resultado de la PCR	69
4.3.- Resultados del estudio de sensibilidad	69
4.4.- Resultados del polimorfismo genético mediante 15 MIRU-VNTR ...	71
5.- DISCUSIÓN	95
5.1.- Sobre la evolución epidemiológica y clínica de la tuberculosis	97
5.2.- Sobre el estudio de sensibilidad.....	106
5.3.- Sobre la caracterización molecular	109
6.- CONCLUSIONES	119

BIBLIOGRAFÍA	123
ANEXOS	145
Anexo 1: Encuesta epidemiológica de tuberculosis de la Comunidad Valenciana.	147
Anexo 2: Modelo de plantilla que acompaña la placa para realizar electroforesis capilar	149
Anexo 3: Fragmentos esperables para cada MIRU, número de repeticiones para cada MIRU según el PM obtenido.	150

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Reseña histórica de la tuberculosis

La tuberculosis (TB) acompaña al ser humano desde la más remota antigüedad. Es considerada una de las primeras enfermedades humanas de las que se tiene constancia. "Consumción", "tisis", "mal del rey", "peste blanca" o "plaga blanca" han sido distintas formas con las que se la ha conocido a través de la historia (Farga, 2004; Cartes, 2013). Además, distintas enfermedades causadas por el mismo microorganismo recibieron nombres propios, que aún hoy se utilizan, para designar diferentes localizaciones de la enfermedad tuberculosa, como "el mal de Pott", "la tabés mesentérica" o "la escrófula".

Se presume que el género *Mycobacterium* se originó hace más de 150 millones de años. El origen cronológico de *M. tuberculosis* se ha podido estimar gracias a la aplicación de las modernas técnicas de genética molecular y a la secuenciación del genoma de varias cepas (Daniel, 2006). Se ha considerado que el progenitor más lejano de la tuberculosis pudo haber estado presente, en el este de África, hace unos tres millones de años siendo posible que éste afectara a los primeros homínidos (Gutiérrez *et al.*, 2005). Parece ser que los miembros modernos del complejo *M. tuberculosis* pudieron originarse a partir de un antepasado común africano hace unos 70.000 años (Comas *et al.*, 2013), aunque otros autores estiman la antigüedad entre 15.000 y 20.000 años (Rothschild *et al.*, 2001). A pesar de las diferencias cronológicas con respecto a su origen, sí que existe un consenso acerca de su origen geográfico. Actualmente hay numerosas evidencias que demuestran que evolucionó como patógeno humano en el Este del continente africano, y su dispersión a otras regiones pudo haber ocurrido con las primeras migraciones humanas. También se acepta que la especie más antigua del complejo *M. tuberculosis* sería *M. bovis*. Se ha considerado que el cambio de estilo de vida, de población nómada a una forma sedentaria acontecido durante el periodo Neolítico, pudo favorecer el desarrollo de la TB al propiciar una serie de condiciones como: el aumento de la población, la domesticación de animales y la ingesta de una dieta menos variada (Comas *et al.*, 2013; Cartes, 2013).

Los hallazgos más antiguos de la enfermedad en humanos se encontraron en restos óseos del período Neolítico en un cementerio próximo a Heidelberg (Alemania), supuestamente pertenecientes a un adulto joven, y datados en torno a 5.000 años antes de nuestra era (Bartels, 1907). También se descubrieron datos sugestivos de

tuberculosis en momias egipcias entre los años 3.500-2.650 a.C. Los paleontólogos hallaron en estos restos una serie de anomalías esqueléticas típicas de la enfermedad de Pott (tuberculosis de la columna) y que también se observaron en algunas representaciones artísticas del antiguo Egipto (Cave, 1939; Morse *et al.*, 1964; Zimmerman, 1979). Como describen Salo *et al.* (1994) y Daniel (2000a), algunos estudios realizados en tejidos de momias peruanas sugirieron la presencia de tuberculosis en América en el periodo precolonial. Dichos hallazgos se han visto confirmados por la secuenciación del genoma completo del bacilo (Bos *et al.*, 2014).

La TB era bien conocida en la Grecia clásica. En su libro "Las epidemias", Hipócrates (400 a.C.), el padre de la medicina, denominó tisis o consunción a la enfermedad, refiriéndose al carácter destructivo que tenía, y consideró que era una enfermedad hereditaria con cierta predilección por los adultos jóvenes. Sin embargo, Aristóteles (384-322 a.C.) defendió la naturaleza contagiosa de la tuberculosis. También lo hizo posteriormente, el médico griego Galeno (131-201) y, recomendó a su vez, aire fresco, leche y viajes al mar para el tratamiento de esta enfermedad.

Los registros de TB pulmonar en la Europa de la Edad Media se hallan de forma dispersa. No obstante, se menciona una particular forma de curación de la escrófula (tuberculosis con afectación de nódulos linfáticos cervicales) mediante el denominado "toque real". Se creía que las monarquías europeas poseían poderes sobrenaturales capaces de curar esta enfermedad, mediante la imposición de manos sobre las personas afectadas. Esta práctica se mantuvo durante varios siglos, aplicándose a miles de afectados (Grzybowski & Allen, 1995).

Se estima que en Europa, en el siglo XVII, se inició la epidemia de la TB, alcanzando su máximo apogeo a finales del siglo XVIII y principios del XIX. Durante esa época, el 25% de las muertes de adultos en las ciudades europeas fueron causadas por esta enfermedad. A pesar de su paso arrollador por la sociedad europea, la tuberculosis fue una infección inescrutable hasta que en el siglo XIX se dilucidaron los conceptos fundamentales de la enfermedad. Fue el médico anatomopatólogo francés René Laennec (1781-1826), más conocido actualmente por su invención del estetoscopio, quien en 1819, en su libro "De la auscultación Mediata", expuso claramente la patología de la tuberculosis y también describió la mayor parte de los signos físicos de la enfermedad pulmonar y aportó términos para describir esos hallazgos que todavía, hoy en día, siguen en uso (Daniel, 2000b).

El 24 de marzo de 1882, Herman Heinrich Robert Koch hizo su famosa presentación "Die Aetiologie der tuberculose" a la comunidad científica de Berlín, donde demostró la etiología infecciosa de la enfermedad, y que el agente causal era *M. tuberculosis*. Las contribuciones de Koch a la bacteriología fueron galardonadas con el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1905 (Daniel, 2005; Koch, 1932). Con los avances en el conocimiento de la tuberculosis, las tasas de mortalidad comenzaron su declive a principios y mediados del siglo XIX (Wilson 1990).

En la segunda mitad del siglo XIX se consideraba que el aire fresco y una adecuada alimentación tenían un efecto terapéutico sobre los pacientes tuberculosos. Teniendo en cuenta estos conceptos, Herman Brehmer, en 1859, abrió el primer sanatorio en la región montañosa de Silesia (Alemania). Posteriormente, se fueron creando muchos otros por todo el mundo, de manera que estas instituciones se convirtieron en piezas clave para el control de la TB no sólo porque procuraban un régimen de descanso, una dieta rica y cuidadosamente supervisada y ejercicio para el tratamiento de la enfermedad, sino porque mantenían aislado al enfermo del resto de la comunidad, reduciendo, de esta forma, el contagio (Sauret, 2001).

A principios del siglo XX, dos científicos franceses del Instituto Pasteur, el médico Albert Calmette y el veterinario Camille Guérin, comenzaron sus investigaciones para la elaboración de una vacuna antituberculosa, a partir de una variante atenuada de *M. bovis* que fue denominada posteriormente bacilo de Calmette-Guérin o BCG (Sacula, 1983). Esto supuso un gran avance en el control de la TB.

Una nueva era comenzó con la introducción de los diferentes agentes antituberculosos: la estreptomycin en 1944; el ácido para-aminosalicílico en 1946; la isoniazida en 1952; la rifampicina en 1970; y el establecimiento de programas de tratamiento con más de un medicamento para evitar el desarrollo de resistencias (Toman, 1979). La implementación de campañas antituberculosas, el uso de la vacuna BCG y la aplicación de esquemas de antibioticoterapia, junto con unas condiciones sociales más favorables, permitieron una dramática reducción de la morbimortalidad en muchos países durante el siglo XX. Esta tendencia de disminución se mantuvo hasta 1984, pues a partir de ese momento la incidencia aumentó a nivel global. Los factores que determinaron este resurgimiento de la enfermedad en los países desarrollados fueron: la reducción de los recursos asignados a los programas para la lucha contra la tuberculosis, la pobreza y la inmigración procedente de países en vías de desarrollo

con elevada incidencia (Cummings, 2007). Sin embargo, el factor más importante que influyó en la nueva propagación de la enfermedad fue la aparición en forma pandémica del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), que convirtió a este grupo de riesgo en el más importante para desarrollar la TB (Brudney & Dobkin, 1991). Debido a la falsa creencia de que la TB podría ser erradicada como la viruela, las medidas de control de la enfermedad, así como la investigación básica y clínica, habían sido dejadas de lado y es por ello por lo que aparecieron grandes brotes asociados a la epidemia de VIH, ya que los países de la OMS no estaban preparados para combatirla (Comas & Gagneux, 2009). En 1993, la OMS declaró la TB una emergencia de salud global y se pusieron en marcha nuevos planes de acción a escala mundial para luchar contra la tuberculosis (DOTS-1996).

En el año 2001, la Alianza Alto a la Tuberculosis emitió el “Plan Mundial para detener la Tuberculosis 2001-2005” y, de nuevo, en el 2006, se lanza otro plan mundial “Detener la Tuberculosis 2006-2015” (OMS, 2006). Ambos planes están fundamentados en la estrategia Alto a la TB establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) cuyos objetivos eran: proseguir con la expansión de la estrategia TAES (tratamiento acortado estrictamente supervisado), intentando mejorarla; hacer frente a la tuberculosis resistente a fármacos (especialmente la TB multiresistente MR-TB y la extremadamente resistente XDR-TB); contribuir al fortalecimiento de los sistemas de salud y promover la investigación. Estas estrategias son las que se siguen en la actualidad con el objetivo de controlar, reducir y eliminar esta enfermedad que, aun hoy en día, continua escribiendo su historia en las páginas de la humanidad.

1.2.- Aspectos epidemiológicos

1.2.1.- Situación de la tuberculosis en el Mundo

La TB es un problema grave de Salud Pública. Aun hoy, en pleno siglo XXI, es una de las enfermedades infecciosas humanas más importantes causantes de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Según las estimaciones de la OMS publicadas en su 19º informe, en 2013, 9 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1,5 millones, de los que 360.000 eran VIH-positivos, fallecieron por esta causa. Más de la mitad de las personas que contrajeron TB (56%) pertenecían a las regiones de Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental, y una cuarta parte a la de África, que también fue la que

presentó mayores tasas de incidencia y mortalidad. Solo India y China representaron el 24% y el 11% de los casos, respectivamente.

En el mismo informe se comunica que 1,1 millones de los 9 millones de personas enfermas por TB (13%) eran VIH-positivas. También se refleja que cuatro de cada cinco casos de muerte, en pacientes coinfectados, se producen en África.

A nivel mundial, la tasa de prevalencia entre 1990 y 2013 descendió en un 41%, y la mortalidad disminuyó un 45%. A pesar de esta considerable reducción, las cifras siguen siendo inaceptablemente altas y hay que acelerar la lucha contra la TB si se quieren alcanzar las metas mundiales de la Alianza Alto a la Tuberculosis consistente en una reducción del 50% para 2015.

Se calcula que a nivel mundial, en 2013, el 3,5% de los casos nuevos y el 20,5% de los tratados previamente tenían TB multirresistente (TB-MR), lo que significa que la cifra estimada de personas que contrajeron TB-MR fue de 480.000 y que un 9% de éstas tenían TB extremadamente resistente (TB-XDR) (WHO, 2014).

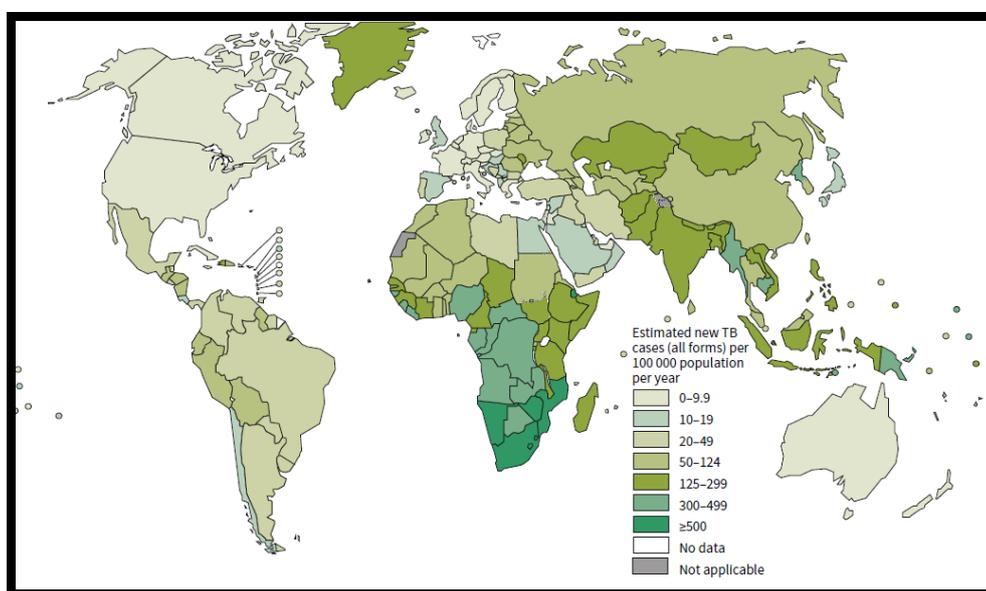


Figura 1: Distribución mundial de incidencia de tuberculosis en el año 2013 (sg. OMS, 2014).

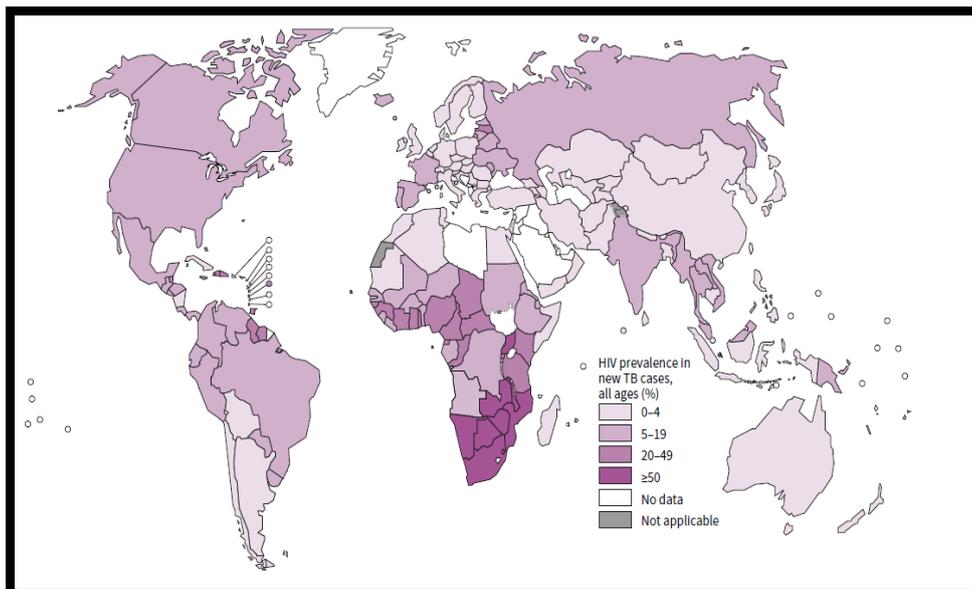


Figura 2: Prevalencia estimada en el 2013 de VIH en los casos nuevos de tuberculosis (sg. OMS, 2014).

1.2.2.- Situación de la tuberculosis en Europa

Según el informe de vigilancia y seguimiento de la TB, publicado en el año 2014, conjuntamente por la Oficina Regional de la OMS para Europa (OMS / Europa) y el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC), se notificaron 353.000 casos nuevos en el año 2012 en la región europea de la OMS, lo que significa una tasa media de 39,4 casos por 100.000 habitantes. Esto representa aproximadamente el 4% de la carga total de TB en el mundo. Durante ese año, el número de casos se redujo en 47.000 con respecto al año 2011, lo que refleja la mayor disminución observada en esta región en los últimos 12 años. La gran mayoría de casos ocurren en los 18 Países de Alta Prioridad, representando el 85% del total de casos de la región. Los países con el mayor número absoluto de casos fueron Rusia, Ucrania, Kazajistán y Uzbekistán (ECDC, 2014).

En líneas generales, la incidencia de TB en la Región Europea de la OMS aumentó rápidamente a partir de 1990, alcanzando un pico alrededor de 1999-2000, pero desde el año 2001 la tasa ha ido disminuyendo a razón de un 5% por año, lo que constituye la disminución más elevada observada en todo el mundo. Si esta reducción avanza, conforme lo estaba haciendo, parece factible que se pueda lograr el objetivo de la Alianza Alto a la TB de una reducción del 50% en el 2015 (OMS, 2006)

En el mismo informe (ECDC, 2014) se estima que en el año 2012 hubo 35.000 muertes por TB en personas VIH-negativas, equivalente a 3,9 por cada 100.000 habitantes, y unas 3.000 a 4.000 en VIH-positivas.

En los 29 países de la Unión Europea (UE), durante el año 2012, se notificaron 68.423 casos, representando una tasa de 13,5 por 100.000 habitantes y una disminución del 6% respecto a 2011. Los tres países con mayor incidencia fueron Rumanía, Polonia y el Reino Unido, constituyendo más de un 50% del total. Y Rumanía, Polonia y España representaron el 70% de la disminución de los casos notificados entre el 2011 y 2012. Los países en los que prácticamente las tasas de notificación se han mantenido constantes o que incluso han aumentado algo han sido: Chipre, Islandia, Malta, Noruega, Suecia y Reino Unido. Todos éstos países tienen en común que presentan una baja incidencia y que su mayor tasa de notificación es en población extranjera (ECDC, 2014).

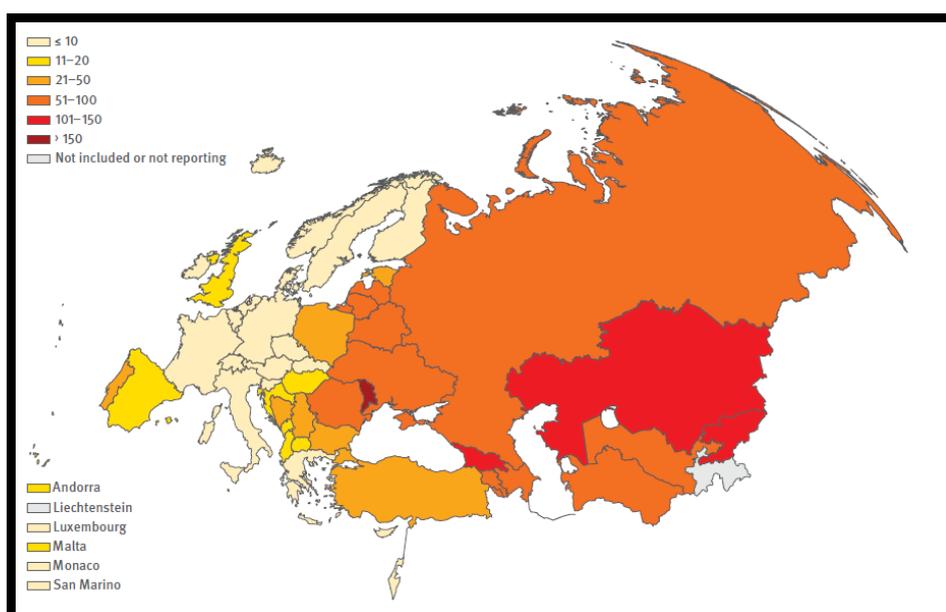


Figura 3: Tasas estimadas de incidencia de TB en la Región Europea en 2012. (sg. ECDC, 2014).

En 2012, la infección por el VIH contribuyó en el 5,2% del total de la incidencia (casos nuevos y recaídas) de TB. El 3,6% fue en los países de la UE y el 5,6% en los pacientes no pertenecientes a la UE. Los países con mayor proporción de VIH-TB son Estonia (13%), Portugal (12%), Ucrania (11%) y Letonia (9%).

1.2.3.- Situación de la tuberculosis en España y en la Comunidad Valenciana

En este apartado se pretende exponer la situación de la TB en nuestro entorno, tanto de una perspectiva general, en España, como desde la perspectiva particular en la Comunidad Valenciana.

1.2.3.1.- En España

Según el informe epidemiológico del Centro Nacional de Epidemiología (CNE, 2013), en España, en el año 2012 se notificaron 6.046 casos de TB, lo que corresponde a una incidencia de 13,1 casos por 100.000 habitantes. Esta tasa es un 11% inferior a la del año 2011, en que fue de 14,7 casos por 100.000 habitantes. Del total de casos, 4.420 correspondieron a TB respiratoria, 106 a meningitis tuberculosa y 1.520 a TB de otras localizaciones.

Del total de casos declarados, 4.042 (67%) eran nacidos en España, mientras que 1.870 (31,2%) habían nacido fuera de nuestro país. El porcentaje de casos en extranjeros varía mucho entre las comunidades autónomas. La Rioja (49%), Murcia (47%), Cataluña (46%) y Madrid (46%) fueron las que presentaron mayor proporción de pacientes de origen extranjero. Por el contrario, Galicia (7%) y Extremadura (1%) fueron las que tuvieron menores porcentajes (CNE, 2013).

De los 1.870 extranjeros, se tenía información del lugar de nacimiento en 999 casos (53%), siendo los países más representados Marruecos (22%), Rumanía (10%), Pakistán (10%) y Bolivia (9%).

En cuanto a la coinfección con el VIH, en el momento del diagnóstico de TB, el 8,8% de los casos eran VIH positivos y 91,2% negativos.

El Centro Nacional de Microbiología (CNM), que recibe muestras de todo el país para su identificación, estudio de sensibilidad y cepas para confirmación de resistencias, recibió 871 cepas en 2012, de las cuales 37 (4,3%) fueron multiresistentes (TB-MR), y, de éstas una fue extremadamente resistente (TB-XDR) (CNE, 2013).

1.2.3.2.- En la Comunidad Valenciana

Durante el año 2012, se notificaron al Sistema de Análisis de la Vigilancia Epidemiológica (AVE) 541 casos de TB, de los que 508 fueron en población autóctona, 20 fueron importados (casos de TB que con toda probabilidad han desarrollado la enfermedad en su país) y 13 correspondieron a personas con residencia habitual en otra comunidad autónoma. La tasa fue de 9,9 por 100.000 habitantes en población autóctona, cifra que representó un descenso del 16,8% respecto a la tasa registrada en 2011, que fue de 11,9 por 100.000 (Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat, 2013).

Desde finales de la década de los años 90, las tasas de TB en la Comunidad Valenciana mantienen una tendencia descendente; de los 24 casos por 100.000 habitantes del año 1998 a la tasa registrada en 2012 se ha producido una disminución del 58,5%, lo que representaría un descenso anual del 4,2%, hecho similar a lo que ha ocurrido en España. La tasa más baja se registró en la provincia de Alicante con 8,4 por 100.000 habitantes, seguida de Castellón con 9,6 y la de Valencia que fue de 11,2, superior a la registrada en toda la Comunidad.

En este mismo periodo, el número de casos notificados en población extranjera fue aumentando progresivamente, así como la proporción que éstos representan respecto del total. En el año 1998, los casos de TB en extranjeros representaban el 2,7% de los declarados, y se incrementaron hasta que en el 2008 pasaron a ser el 37,6%. Sin embargo, en el 2012 la proporción de TB en extranjeros disminuyó, pasando a ser del 32,5%. Los países que aportaron mayor número fueron, al igual que en años anteriores, Rumanía, Marruecos, Bolivia y Ecuador. De los 508 casos, 374 (73,6%) casos de TB fueron pulmonares y 134 (26,4%) TB extrapulmonares, destacando la TB pleural con 52 y la linfática con 27.

En el año 2012, la coinfección con el VIH en toda la Comunidad Valenciana, fue del 6,7% de los casos.

El 5,8 % de las cepas estudiadas fueron resistentes a isoniazida, mientras que un 2,6 % fueron MDR. De entre los casos nuevos, se realizó el estudio de sensibilidad a 315 cepas, de las cuales 18 fueron resistentes a isoniazida, representando una resistencia primaria a isoniazida del 5,7% (18/315) (Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat, 2013).

1.3.- Etiología, patogenia y transmisión de la tuberculosis

1.3.1.- Etiología y patogenia

La TB está causada por unos microorganismos que se incluyen taxonómicamente en el Orden *Actinomycetales* y en la Familia *Mycobacteriaceae*, en la cual sólo se incluye un género, el género *Mycobacterium*. La TB puede deberse a cualesquiera de las seis especies que integran el complejo *Mycobacterium tuberculosis*: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedii* y *M. caprae*. Desde un punto de vista sanitario, la enfermedad producida por *M. tuberculosis* es la más importante y la causante de la mayoría de los cuadros patológicos en humanos.

M. tuberculosis es un bacilo delgado, ligeramente curvado, de 1 a 4 µm de longitud, cuya pared celular es compleja y rica en lípidos (ácidos micólicos), los cuales le confieren su particular ácido-alcohol resistencia (Figura 4). Dentro de sus principales características biológicas cabe destacar que:

- es un parásito estricto, con lo que la transmisión es persona a persona;
- no tiene toxinas conocidas, por lo que carece de toxicidad primaria;
- es aerobio, con lo que su crecimiento depende de la presión de oxígeno del órgano afectado;
- tiene una multiplicación lenta, factor que favorece su estado de latencia y su tendencia a la cronicidad;
- y tiene un componente antigénico muy complejo, que determina diferentes grados de virulencia, patogenicidad y grandes variaciones en la respuesta inmunológica del hospedador (Farga & Caminero, 2011; Lawn & Zumla, 2011).

La TB es una enfermedad contagiosa y el mecanismo de transmisión más importante es la vía aérea. La infección se adquiere por inhalación de partículas infecciosas, en forma de aerosoles, cargadas de micobacterias que el enfermo, especialmente el bacilífero, elimina al hablar, estornudar y, sobre todo, al toser. Sin embargo, tan solo las gotitas de 1-5 µm son las realmente infecciosas, al poder llegar y depositarse en la región alveolar.

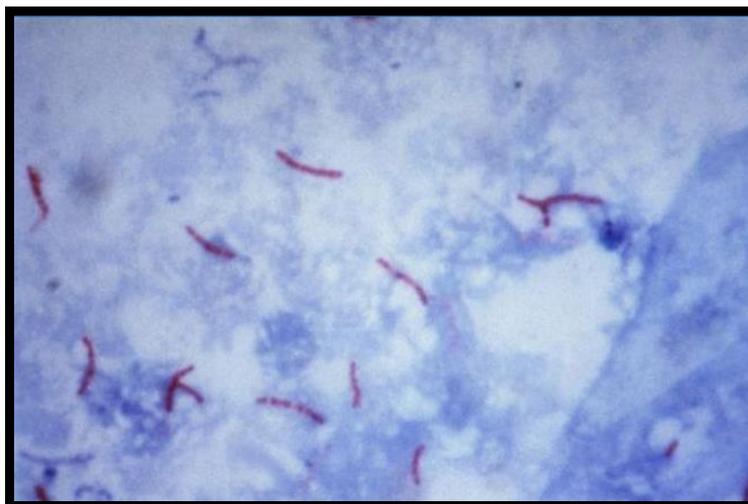


Figura 4: *Mycobacterium tuberculosis*, observado con microscopio óptico y teñido con Ziehl-Neelsen

Otros mecanismos de transmisión reconocidos, aunque más infrecuentes, son: a) vía digestiva (segunda en frecuencia), como ocurriría con *M. bovis* a partir del ganado bovino; b) vía urogenital; c) vía cutáneomucosa; d) por inoculación; y e) vía transplacentaria (200-300 casos descritos).

La infección inicial se produce en los pulmones y en la mayoría de los casos es controlada por la inmunidad celular. Tan sólo el 5% de los casos escapará de este control y evolucionará a una TB primaria. En un 95% de los contagiados, los bacilos permanecerán controlados en estado latente toda la vida (ITL) y un pequeño porcentaje de éstos (10%) evolucionará a enfermedad, años después, como un proceso de reactivación. En general, la probabilidad de enfermar dependerá, en gran medida, de diversos factores que interfieren directamente con la inmunidad celular del huésped como son la desnutrición, el alcoholismo, la edad, la infección por el VIH y la diabetes. En estos casos, el riesgo a desarrollar TB a lo largo de la vida será mayor (Parrish *et al.*, 1998; Caminero, 2003; Alcaide *et al.*, 2005).

1.3.2.- Transmisión

Para que pueda transmitirse *M. tuberculosis* de persona a persona se requiere, en general, un contacto intenso y prolongado, estando determinada por características del caso índice (cantidad de bacilos presentes en el esputo, intensidad de la tos y presencia de cavitación en la radiografía de tórax), de las personas expuestas y del

grado de intimidad y de la duración de la exposición. También pueden ser factores determinantes para la transmisión, la virulencia de la cepa, el efecto de la quimioterapia en la infección y la existencia de infección tuberculosa latente en las personas expuestas. Los convivientes y contactos cercanos (personas con contacto prolongado, frecuente o intenso) tienen más riesgo de infectarse que las personas con relación esporádica o casual (American Thoracic Society, 2005; González-Martín *et al.*, 2010).

El tratamiento correcto de la enfermedad es la mejor medida de control. Los pacientes con TB pulmonar sensible a los antibióticos pueden dejar de ser contagiosos a las tres semanas de haber iniciado el tratamiento, aunque hasta el segundo mes puede persistir un riesgo bajo de contagio. Por tanto, se aconseja que, a las tres semanas de tratamiento, a los enfermos que ya tengan baciloscopia negativa se les retire las medidas de aislamiento y a los que aun la tengan positiva se mantenga, aunque de manera mucho menos estricta, hasta la negativización de la misma. La capacidad de los fármacos para eliminar la infectividad es una de las razones por las cuales la detección de los casos infecciosos y el tratamiento con la combinación de tuberculostáticos se constituyen como el principal medio para interrumpir la propagación de la TB (Vidal *et al.*, 2002).

Después de la detección de casos e inicio del tratamiento, la siguiente prioridad en el control de la TB es la investigación de los contactos. Ésta debe realizarse a todos los pacientes con sospecha o confirmación de TB activa, puesto que sus contactos tienen mayor riesgo de infección y de desarrollar la enfermedad tuberculosa (Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children (American Thoracic Society, 2000).

1.3.3.- Estudio convencional de contactos

Como se acaba de comentar, un programa de control de TB debe velar, prioritariamente, por el diagnóstico y tratamiento temprano de los enfermos, garantizando el correcto cumplimiento de la terapia y, cuando se alcanzan tasas de cumplimiento adecuadas, se ha de profundizar en el estudio de contactos (UITB, 1999).

Desde que se demostró la eficacia de la isoniazida en la prevención de la TB entre los contactos íntimos de personas enfermas, el estudio convencional de contactos

(ECC) y el tratamiento de la infección tuberculosa latente (TITL) se convirtieron en una estrategia fundamental para el control de esta enfermedad (Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat, 2007).

Para llevar a cabo el estudio correctamente, se debe considerar los contactos frecuentes y los esporádicos, debiéndose evaluar por un experto cada situación y los límites del estudio. El ECC, a partir de un caso índice (el primero que conocemos), tiene como objetivos: a) diagnosticar a los infectados y a los enfermos (casos secundarios) entre las personas relacionadas con un enfermo tuberculoso conocido, siguiendo el principio de "la piedra en el estanque" (Veen, 1992) o sistema de los círculos concéntricos (Iseman *et al.*, 1976); b) tratar a los enfermos y a los infectados que lo precisen (Ferebee, 1970); y c) reconstruir la cadena de transmisión para identificar, siempre que se pueda, al caso índice verdadero (Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat, 2007).

Es conocido que la evolución epidemiológica de la TB ha cambiado como consecuencia de varios factores como la coinfección con el VIH, el crecimiento de la pobreza, el aumento de la incidencia de la TB-MR y de las migraciones (Brudney & Dobkin, 1991). Por otra parte, hoy en día conocemos mucho mejor la transmisión de la enfermedad y sus factores de riesgo. Todos estos parámetros han de ser evaluados en un contexto específico y se deben tener en cuenta a la hora de diseñar el estudio de contactos. Cuanto más adaptado esté al contexto, más elevado será el número de casos secundarios detectados (Cayla & Orcau, 2003).

Según se indica en el "Manual de estudio convencional de contactos y tratamiento de la infección latente en la tuberculosis", editado por la Generalitat Valenciana en el año 2002 (Generalitat Valenciana, Conselleria de Sanitat, 2002), las fases en la realización del ECC, que debe iniciarse tan pronto como se establezca el diagnóstico del caso índice, serán las siguientes:

- 1) Censo de contactos: Se realiza el censo de personas expuestas y que, por tanto, deben ser sometidas al ECC, según el riesgo teórico de infección;
- 2) Cribado mediante la prueba de la tuberculina (PPT): El estudio se realizará siguiendo el sistema de círculos concéntricos o de "la piedra en el estanque" que consiste en iniciar la investigación por los contactos de mayor riesgo (primer círculo) e ir ampliando el estudio hasta que la prevalencia de la infección encontrada sea la prevista en dicha población (véase en la Figura 5). Si se

detecta un nuevo caso bacilífero entre los contactos, debe iniciarse otra vez, a partir de éste, el esquema de círculos concéntricos;

La PPT es una de las pruebas diagnósticas que todavía sigue vigente en la medicina actual a pesar de tener más de un siglo de experiencia; también se la conoce como prueba de Mantoux. Actualmente se administra, mediante inyección intradérmica, en la cara anterior del antebrazo, 2 UT de derivado proteico purificado tuberculínico (PPD), utilizándose en España la PPD RT-23. La lectura se realiza a las 48-72 horas y se mide en mm la induración en la zona de inyección (diámetro transversal con respecto al eje del brazo). Se consideran positivos, con una induración ≥ 5 , a aquellos contactos íntimos con casos índices o sospechosos, los sospechosos de enfermedad tuberculosa clínica o radiológica y los pacientes con infección por VIH. Por otro lado, en cualquier otra circunstancia se consideraran positivos aquellos que desarrollen una induración ≥ 10 mm.

Para el diagnóstico de la ITL, en la actualidad disponemos, además de la PPT, de pruebas diagnósticas *in vitro* que, en el ámbito internacional, se conocen con el acrónimo de **IGRAs** (Interferon-gamma-release assays) y que se realizan a partir de muestras heparinizadas de los pacientes (Lalvani *et al.*, 2001). Esta tecnología se fundamenta en la detección por enzimoimmunoensayo del interferón-gamma (IFN- γ) liberado después de una estimulación con antígenos tuberculosos específicos ESAT-6 (*early secreted antigenic target 6*), CFP-10 (*culture filtrate protein 10*) y TB7.7 (p4).

- 3) Diagnóstico: Según el resultado del estudio con la PPT, o de los IGRAs, se clasificarán a los contactos en no infectados y en infectados. A estos últimos se les solicitará una radiografía posteroanterior y lateral de tórax, para descartar enfermedad;
- 4) Seguimiento de los contactos de riesgo no infectados, de manera que se debe realizar una segunda prueba de tuberculina a los 2 meses del último contacto con el paciente;
- 5) TITL: Consiste en la administración del tratamiento preventivo a los individuos infectados en los que se sospecha infección reciente con el fin de evitar el desarrollo de la enfermedad;

- 6) Supervisión del tratamiento y seguimiento;
- 7) Cierre del estudio cuando todos los casos censados hayan sido analizados. Tras culminar este estudio, se deberá reconstruir la cadena teórica de transmisión (Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat, 2002).

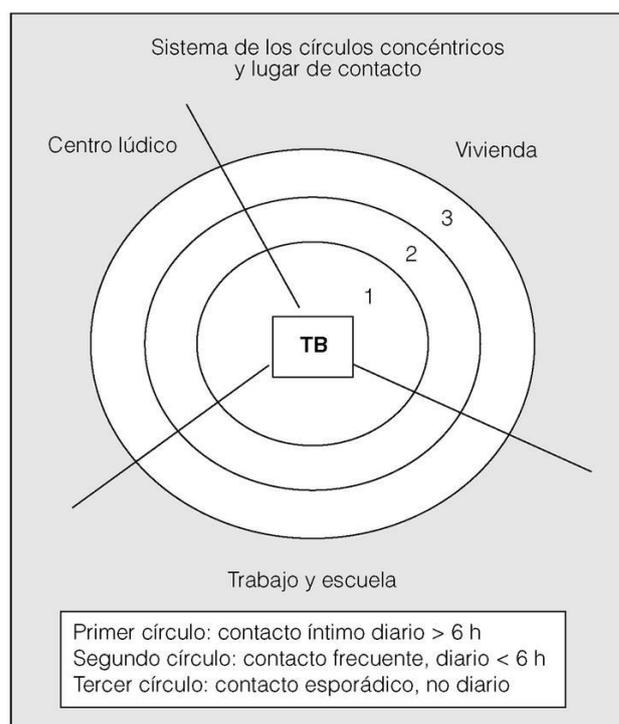


Figura 5: Sistema de los círculos concéntricos (Vidal *et al.*, 2002).

De acuerdo con lo plasmado en la Figura 5, en el primer círculo se encontrarían los contactos íntimos y convivientes, aquellos que viven en el mismo domicilio del caso, son parejas sexuales habituales o tienen una relación que implique un contacto continuado y estrecho con el paciente. En el segundo círculo, se encontrarán los contactos próximos habituales, como compañeros de trabajo o colegio, amigos o parientes que mantengan relación habitual con el caso. Y ya en el tercer círculo se encontrarían los contactos esporádicos (Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat, 2007).

Cada Departamento de Salud realiza el ECC a todos los pacientes con TB como una parte rutinaria de sus programas de control y lo puede llevar a término un grupo

multidisciplinar de profesionales que incluye médicos, microbiólogos, epidemiólogos, enfermeras y personal técnico (Borrell *et al.*, 2009).

Como sabemos, el ECC es imprescindible en cualquier programa de control de TB, aunque presenta una serie de limitaciones que se explican más adelante. Esto ha hecho necesaria la búsqueda de nuevos métodos epidemiológicos que permitan documentar, de una forma más precisa, las cadenas de transmisión. Con las técnicas moleculares se ha conseguido un gran avance en el estudio de la epidemiología de la TB.

1.4.- Epidemiología molecular de la tuberculosis

1.4.1.- Descripción

El término Epidemiología Molecular viene de la integración de la Biología Molecular, la Medicina Clínica, la Epidemiología y la Estadística (Mathema *et al.*, 2006). Es una ciencia que estudia la dinámica de transmisión de las enfermedades infecciosas y nos ayuda a comprender mejor la epidemiología mediante la utilización de métodos de caracterización molecular, como un complemento a los enfoques epidemiológicos clásicos. La tipificación molecular de cepas de una misma especie permite conocer los aislamientos procedentes de diferentes individuos y relacionarlos unos con otros para determinar las cadenas de transmisión de la enfermedad (Takashima & Iwamoto, 2006). Más concretamente, asocia características epidemiológicas con las características biológicas de los aislados clínicos (Mathema *et al.*, 2006). Existe una gran variedad de técnicas que tienen como objeto comparar la composición de los ácidos nucleicos de dos o más microorganismos, con el objeto de poder conocer la posible relación entre aislamientos vinculados epidemiológicamente (Wong *et al.*, 2011).

A mediados de los años 80 se incorporaron, por primera vez, estas técnicas para intentar discriminar entre aislados clínicos de *M. tuberculosis* (Collins & de Lisle, 1984). Anteriormente al desarrollo de esta tecnología, los estudios se basaban en identificar las características fenotípicas de las cepas, como la morfología de las colonias, la susceptibilidad a los antibióticos (antibiotipo) y la tipificación por fagos (fagotipado). Éstos habían sido los únicos marcadores disponibles para estudiar la epidemiología de

la TB a pesar de no proporcionar suficiente discriminación. Estos sistemas fenotípicos eran, sin lugar a dudas, limitados para establecer diferencias o similitudes concluyentes entre microorganismos (Kontsevaya *et al.*, 2011).

Ya al principio de los años 90, estas técnicas estaban más perfeccionadas y se alcanzaron los primeros éxitos en la obtención de secuencias repetitivas en el genoma de *M. tuberculosis*. Éste fue el punto de partida para poder comparar las huellas genéticas de los distintos aislamientos y, por tanto, establecer diferencias entre diversas cepas. Como se ha comentado anteriormente, el detectar estas diferencias ha permitido obtener nueva información sobre la epidemiología de la enfermedad, permitiendo ayudar a desarrollar medidas que disminuyan la transmisión de la enfermedad (García-Pachón & Rodríguez, 2005).

Además, la epidemiología molecular ha introducido nuevos conceptos hoy en día ampliamente utilizados en estudios clínicos y de investigación, como son la reinfección (Chiang & Riley, 2005) y la infección múltiple (Hass *et al.*, 1995), la pérdida de *fitness* asociada a la resistencia (Gagneux *et al.*, 2006), virulencia diferencial (Reed *et al.*, 2007) y el desarrollo y capacidad de protección de las vacunas (Abebe & Bjune, 2006).

Todo esto ha sido posible gracias a la secuenciación total del genoma de *M. tuberculosis*. Tras la secuenciación se identificaron diversos marcadores genéticos utilizados para la caracterización y diferenciación de cepas (Kwara *et al.*, 2003). Las técnicas de tipificación molecular pueden estar basadas en el análisis del grado de similitud y distribución de estos marcadores genéticos (elementos variables) entre distintos aislamientos (véase Figura 6), en el estudio de la presencia o ausencia de determinados fragmentos de ADN, o bien en la comparación del genoma completo del microorganismo (Nguyen *et al.*, 2004).

Las estrategias de estas técnicas, independientemente de la metodología utilizada, se basan en el hecho de que en un análisis poblacional de casos con TB ocurre lo siguiente: 1) los casos causados por cepas de *M. tuberculosis* con idéntico genotipo (*cluster o agrupamiento*) son candidatos a pertenecer a una cadena de transmisión reciente de la infección. Se asume que todos los miembros de un *cluster* están implicados en una misma cadena de transmisión reciente, que implicaría una infección exógena; y 2) en los casos causados por cepas cuyo genotipo no se ha relacionado con otro caso de la población ("cepas huérfanas"), probablemente la enfermedad se haya producido por reactivación de infecciones latentes (Barnes & Cave, 2003).

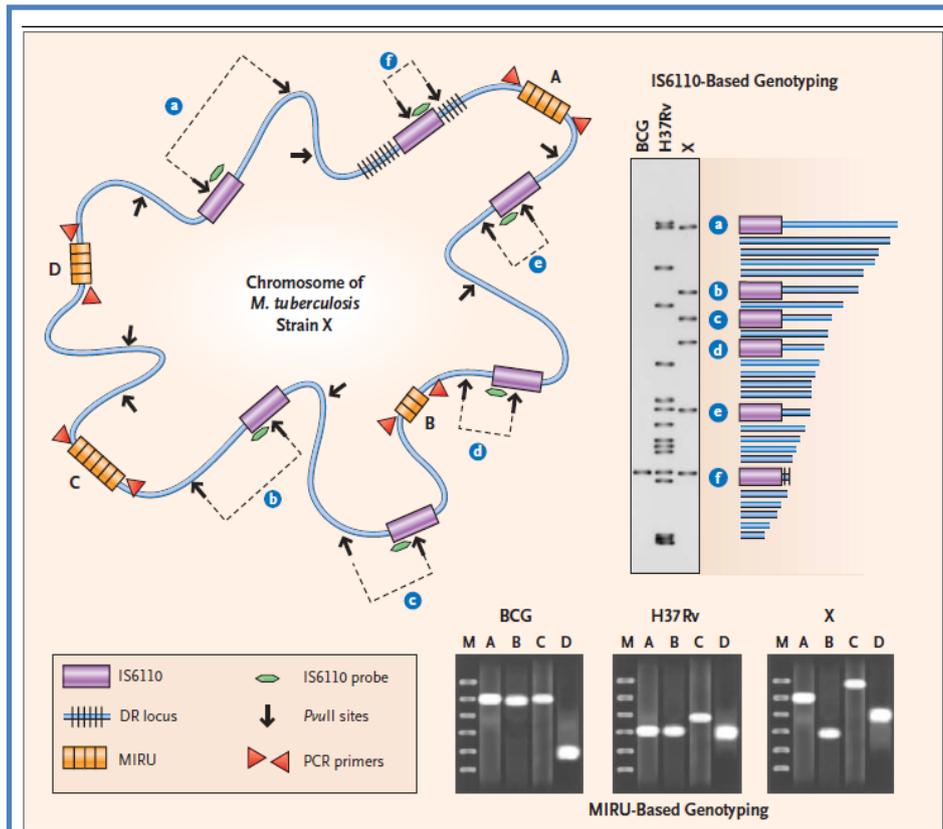


Figura 6: Ubicación de algunos marcadores moleculares en el cromosoma de *Mycobacterium tuberculosis* (sg. Barnes & Cave, 2003).

Los requisitos ideales que debería de reunir un método de tipificación molecular serían: elevado poder de discriminación, metodología sencilla y rápida, coste económico mínimo, resultados reproducibles, aplicabilidad directa sobre muestras clínicas, que los marcadores genéticos sean estables y que tenga utilidad para discriminar entre los restantes componentes del complejo *M. tuberculosis*. Ninguno de los métodos conocidos en la actualidad reúne todas las condiciones expuestas (Alcaide *et al.*, 2005; Fernández-Cuenca *et al.*, 2013).

1.4.2.- Técnicas

Entre las técnicas más utilizadas para la tipificación molecular de la TB se encuentran: 1) el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de la secuencia de inserción IS6110 (RFLP-IS6110); 2) el espoligotipado (spoligotyping); y

3) el número de repeticiones variables en tándem de las unidades repetitivas interesparadoras en micobacterias (MIRU-VNTR).

Otras técnicas, desarrolladas a lo largo de los años, que no han tenido tanta difusión, serían: FAFLP (Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism); PFGE (electroforesis en campo pulsado); PGRS (polimorfismos en secuencias repetidas ricas en G-C); y SNP (polimorfismo en un único nucleótido).

1.4.2.1.- Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de la secuencia de inserción IS6110 (RFLP-IS6110)

La mayoría de los primeros estudios de epidemiología molecular aplicados en TB se basaron en el uso de esta técnica. Debido a su reproducibilidad, poder discriminatorio, transferabilidad de los resultados entre distintos laboratorios y su relativo bajo costo, fue considerado durante años el método de referencia y ha sido el más utilizado hasta la fecha (Daley, 2005).

Se basa en el número variable de copias de la secuencia de inserción IS6110, específica de *M. tuberculosis* complex, que presentan las diferentes cepas (de 0 a 25 copias) y en su posición en el genoma (Warren *et al.*, 2009). Van Embden *et al.* (1993) propusieron un protocolo estandarizado, lo que condujo a su uso generalizado por todo el mundo. Para la realización de esta técnica, se necesita la obtención de cultivo de *M. tuberculosis*, la extracción del ADN genómico de la bacteria y su digestión con la enzima de restricción PvuII, que posee una única diana en los 1355 pb de la IS6110. Los fragmentos que se obtienen son de diferente peso molecular, ya que las distancias entre las diferentes secuencias IS6110 en el genoma son variables. Estos fragmentos se separan por electroforesis en función de su peso molecular, se desnaturalizan y se transfieren a una membrana de nylon. Posteriormente, se efectúa una hibridación con una sonda marcada, revelando su posición. Los patrones de bandas obtenidos reflejan el número de copias de IS6110 y su diferente posición en el genoma (véase Figura 7).

Las cepas que poseen el mismo número y posición de bandas, se consideran iguales y pertenecientes a un mismo clon. Las cepas que difieren en 1-2 bandas, probablemente hayan estado emparentadas en el pasado. Se han establecido bases de datos nacionales e internacionales (Alcaide *et al.*, 2005).

Esta técnica presenta algunas limitaciones, ya que no puede utilizarse en cepas que posean menos de 5 copias de la secuencia de inserción en su cromosoma, en cuyo caso es preciso utilizar otras técnicas (Soini *et al.*, 2001). Además, requiere grandes cantidades de ADN (lo que implica la realización de subcultivos que precisan varias semanas), es técnicamente larga y compleja, permite el análisis simultáneo de pocas cepas y el coste del programa de apoyo informático es elevado (Barnes & Cave, 2003; Alcaide *et al.*, 2005).

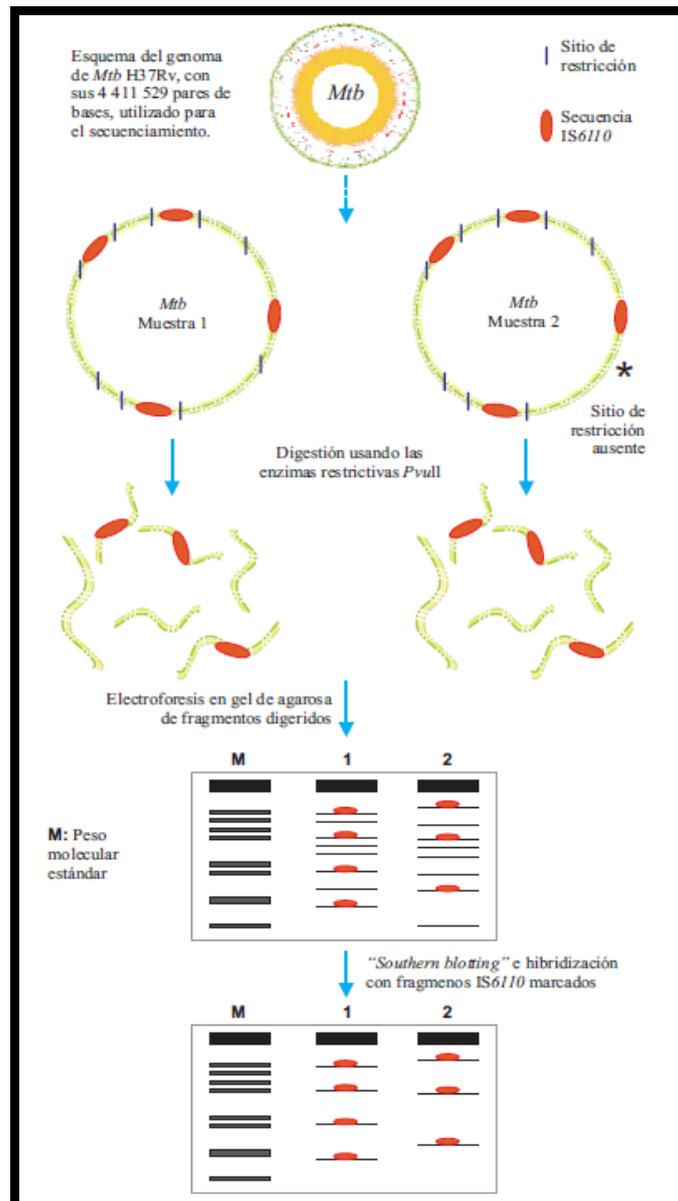


Figura 7: Método, representado de forma esquemática, del RFLP-IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis* (sg. Wong *et al.*, 2011).

1.4.2.2.- Espoligotipado ("Spoligotyping")

El "Spoligotyping" fue estandarizado por Kamerbeeck *et al.* (1997). Se basa en la existencia en el genoma de una zona (región DR) que contiene unas secuencias repetitivas de 36 pb. Entre éstas hay secuencias espaciadoras que son de composición y longitud variables en cepas diferentes. El patrón de espaciadores de una cepa puede ser utilizado para el genotipado (tipado de oligonucleótidos espaciadores: "spoligotyping"), ya que las cepas difieren en términos de ausencia o presencia de sus cebadores específicos.

Tomando como referencia las secuencias espaciadoras de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv y de la cepa P3 de *M. bovis* BCG, se diseñaron 43 sondas. Estas sondas se alinean y fijan en una membrana. De las cepas en estudio, se amplifica la región DR utilizando dos cebadores orientados opuestamente entre ellos y complementarios a la secuencia DR. Durante la amplificación, los iniciadores darán lugar a productos de diferente tamaño. Estos productos de PCR se transfieren a la membrana donde están fijadas las sondas y la hibridación que tiene lugar se evidencia porque uno de cada par de cebadores está marcado con biotina (véase Figura 8). Los resultados se expresan como positivo o negativo para cada espaciador y la lectura se realiza como un código digital (Dale *et al.*, 2001).

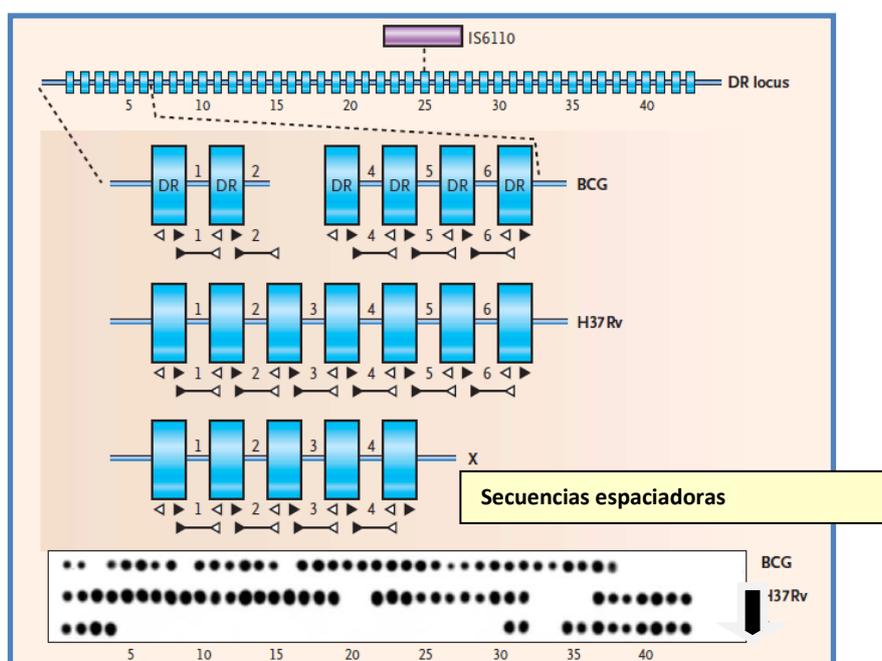


Figura 8: Esquema del espoligotipado (sg. Barnes & Cave, 2003).

Existe una base de datos internacional con más de 11.000 patrones ("espoligotipos") de aislamientos de *M. tuberculosis* obtenidos en más de 90 países (Filliol *et al.*, 2002).

La técnica de espoligotipado tiene algunas ventajas con respecto al RFLP-IS6110. Por una parte, se puede utilizar en aquellas cepas que poseen menos de 5 copias de IS6110 en su genoma; por otra parte, requiere pequeñas cantidades de ADN, es relativamente sencilla, rápida y tiene un coste menor (Kamerbeeck *et al.*, 1997). Sin embargo, posee menor poder de discriminación que el RFLP-IS6110, por lo que se puede utilizar como complemento de éste (Kremer *et al.*, 1999).

1.4.2.3.- MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Numbers of Tandem Repeat*)

El número de secuencias repetidas en tándem (VNTR) surgieron como marcadores valiosos para el genotipado de los aislados de diversas especies bacterianas. Estas secuencias, conocidas también como minisatélites, se describieron por primera vez en los genomas eucariotas (Supply *et al.*, 2000). Muchas de estas secuencias presentan hipervariabilidad alélica relacionada con el número de repeticiones y/o con la ligera variabilidad en las secuencias, por lo que se puede utilizar como marcadores a nivel epidemiológico. En las últimas décadas, se ha descrito en las micobacterias regiones similares pasándose a llamar MIRUs (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat*). Supply *et al.* (1997) estandarizaron la técnica para la identificación de MIRUs.

Los MIRUs se denominan "minisatélites" ya que su tamaño oscila entre 40 y 100pb. Son unidades de repetición intergénica y se encuentran como repeticiones contiguas dentro del genoma de especies del complejo *M. tuberculosis*. El cromosoma de *M. tuberculosis* complex contiene 41 MIRUs localizados en diferentes loci (véase Figura 9) (Supply *et al.*, 2006).

Los genes flanqueantes de estos MIRUs están involucrados en diversas vías metabólicas que incluyen biosíntesis o degradación de ácidos grasos, producción de energía y transducción de señales (Supply *et al.*, 2000).

Los MIRUs fueron clasificados por Supply *et al.* (1997) en tres tipos principales: los tipo I, que contienen secuencias de 77pb; los tipo II con secuencias de 24 pb; y los

tipo III con secuencias de 15 pb. De los 41 MIRUs descritos, se observó que 12 presentaban elevado polimorfismo (Supply *et al.*, 1997) aunque recientemente se ha descrito que 15 y hasta 24 de estas unidades, son altamente polimórficas y varían en el número de copias entre aislados de *M. tuberculosis* no relacionados, confiriéndole un mayor poder discriminatorio a esta metodología (Sola *et al.*, 2003; van Deutekom *et al.*, 2005; Supply *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2007; de Beer & van Soolingen, 2012).

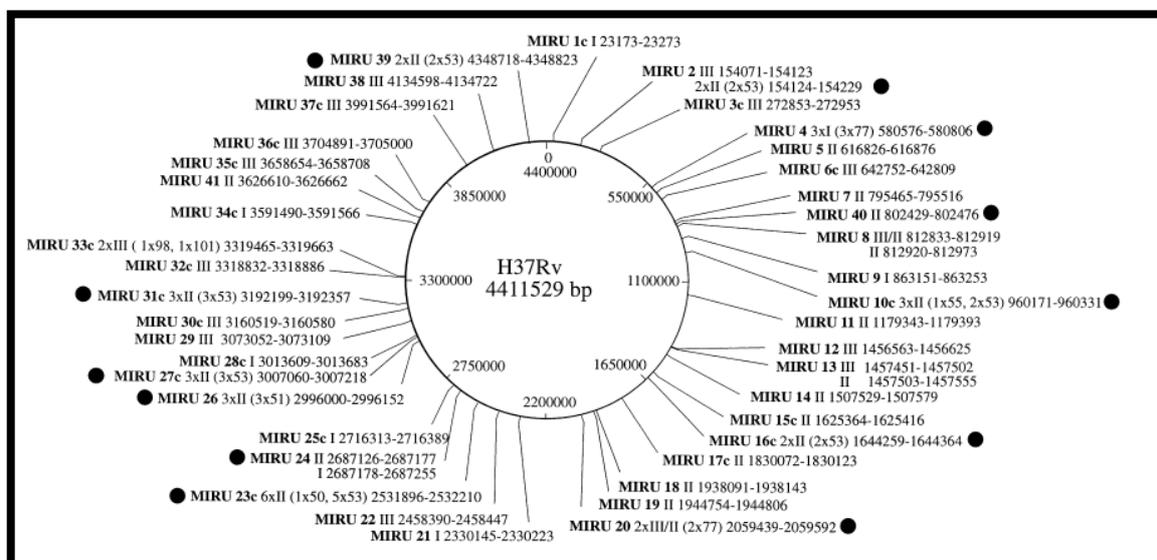


Figura 9: Posición de los 41 MIRUs loci en el cromosoma de *M. tuberculosis* H37Rv (Supply *et al.*, 2000).

La tipificación molecular mediante VNTR-MIRUs se fundamenta en la variabilidad en el número de copias de secuencias repetitivas, de 40 a 100 pb, dispuestas en tándem en 12, 15 o 24 zonas intergénicas (=loci) diferentes del genoma de *M. tuberculosis*. El número de repeticiones varía entre 2 y 8 copias de cada locus (12, 15 y 24), dando lugar aproximadamente a 20 millones de posibles combinaciones de alelos (Supply *et al.*, 2001; Supply *et al.*, 2006).

Esta técnica se basa en la amplificación mediante PCR de cada locus MIRU con 12, 15 o 24 pares de cebadores dirigidos específicamente a cada uno de éstos y en la determinación de los tamaños de los amplicones después de realizar electroforesis en un gel de agarosa o mediante secuenciación. Como la longitud de las unidades de repetición se conoce, los tamaños de los productos de la PCR reflejan el número de repeticiones de cada locus MIRU (dependiendo de los tamaños de los productos de la PCR, se puede conocer el número de repeticiones en tándem). Con las bandas

obtenidas tras electroforesis o los picos tras la secuenciación, se calcula el tamaño de cada uno para posteriormente asignar un dígito correspondiente al número de copias encontradas para cada uno de los MIRUs. El análisis de los 12, 15 o 24 loci más polimórficos proporciona un código de 12, 15 o 24 dígitos que permite comparar los aislados estudiados entre sí (Supply, 2005) y, además, integrar los datos en una base de datos internacional, accesible por Internet, para poder comparar los resultados (Supply *et al.*, 2001). Una vez obtenidos todos los datos, se introducen en el portal de internet <http://www.miru-vntrplus.org> y se determina el número de *clusters* –o agrupaciones- y el de patrones únicos (véase Figura 10).

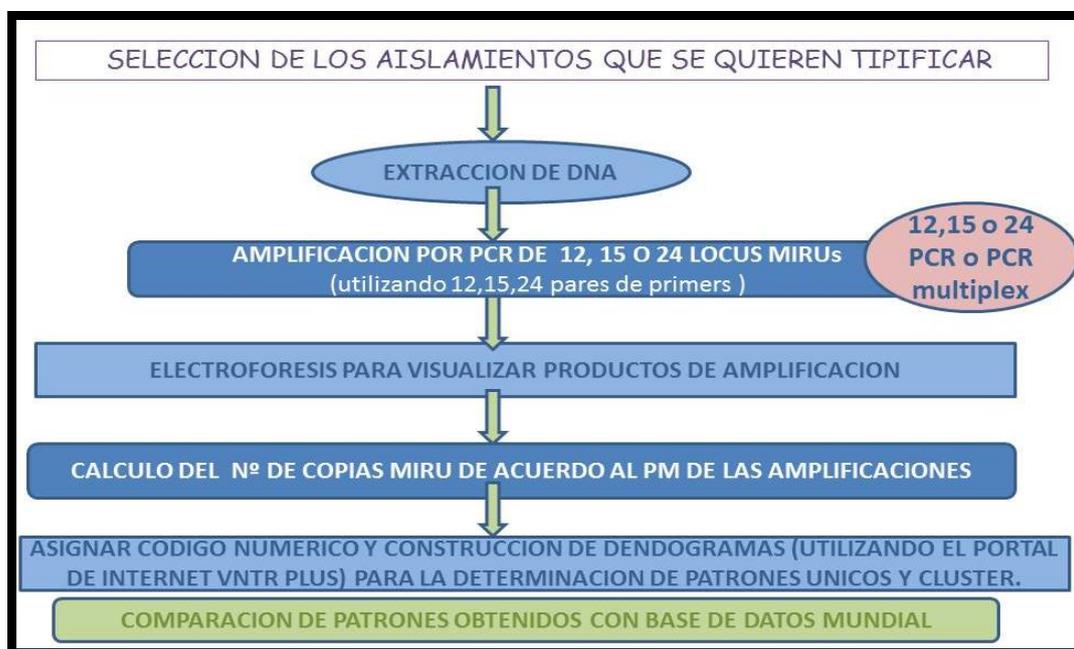


Figura 10: Pasos de la técnica MIRU-VNTR.

Esta base de datos incluye 186 aislados que representan a los linajes predominantes del complejo *M. tuberculosis*. Permite analizar y comparar genotipos basados en 12, 15 o 24 MIRU-VNTR, espoligotipos, SNPs (Polimorfismos de un sólo nucleótido) e IS6110 entre otros, de forma individual o combinados. Las herramientas para la exploración de datos incluyen búsqueda de similitud, creación de árboles filogenéticos y de mínima expansión y mapeo de información geográfica (Allix-Béguec *et al.*, 2008; Weniger *et al.*, 2010)

Esta técnica presenta una serie de ventajas con respecto a la de RFLP. De hecho, se puede aplicar en cepas con menos de 5 copias de IS6110, es más sencilla y rápida de realizar, se puede realizar directamente de los cultivos sin necesidad de purificar el ADN, no se requieren grandes cantidades de ADN, la técnica puede automatizarse y los resultados pueden ser representados en formato digital facilitando su interpretación y comparabilidad (Barnes & Cave, 2003).

En el año 2006, el grupo de Supply publicó la comparación de 29 VNTRs en la que encontró y seleccionó un conjunto de 15 loci con alto poder de discriminación, por lo que la técnica MIRU 12 fue reemplazada por MIRU 15. Hoy en día, esta última se considera la técnica estándar para la discriminación epidemiológica rutinaria de los aislados de *M. tuberculosis* y el sistema de 24 loci como una herramienta exploratoria en estudios filogenéticos (Supply *et al.*, 2006; de Beer *et al.*, 2014), aunque los marcadores basados en secuencia son mucho más robustos para esto último (Comas *et al.*, 2009).

1.4.2.4.- Otras técnicas de tipificación molecular

Janssen *et al.* (1996) describieron la técnica de amplificación basada en el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) como un método prometedor, novedoso y que combinaba la aplicabilidad universal con un alto poder de discriminación y reproducibilidad. Posteriormente, Huys *et al.* (2000) la definieron como una técnica con muy buenas expectativas para la tipificación de micobacterias. Se basa en la digestión del genoma micobacteriano utilizando dos enzimas de restricción, *EcoRI* y *MseI*. En los extremos digeridos se acoplan unos adaptadores que serán reconocidos por una serie de oligonucleótidos, marcados con fluoróforos, complementarios a estas regiones flanqueantes. A continuación, se realiza una amplificación mediante PCR y los productos obtenidos se pueden visualizar en geles de poliacrilamida o mediante un secuenciador automático (Goulding *et al.*, 2000; Kassama *et al.*, 2006). Se diferencia de otros métodos en que estudia todo el genoma de la micobacteria por lo que podría ser más discriminativo que RFLP-IS6110 para confirmar la transmisión reciente (Ruiz *et al.*, 2003). Sin embargo, es un método caro, requiere mucho tiempo y personal muy especializado y, por ello, no es una técnica que se utilice comúnmente (Fernández-Cuenca, 2004).

La electroforesis de fragmentos de restricción en campo pulsante (PFGE) es una técnica ampliamente utilizada para tipificar diferentes microorganismos en brotes epidemiológicos y estudios poblacionales (Fernández-Cuenca, 2004). Sin embargo, en el caso de las micobacterias, la especial composición de su pared celular y por problemas de bioseguridad han hecho que el desarrollo de protocolos normalizados sea especialmente complejo y que los resultados obtenidos sean difíciles de reproducir. En líneas generales, la caracterización molecular de aislados de *M. tuberculosis* con esta técnica requiere la obtención de un cultivo puro en medio líquido, la extracción del ADN de la micobacteria a partir de las células previamente embebidas en agarosa, la digestión del ADN con endonucleasas de restricción y posterior separación de los grandes fragmentos obtenidos mediante electroforesis en campo pulsados. La ausencia de protocolos que permitan generar, almacenar y comparar patrones PFGE, ha limitado su uso en estudios de epidemiología molecular sobre micobacterias (Singh *et al.*, 1999).

El método de tipificación PGRS fue descrito por primera vez por Ross *et al.* (1992). Y analiza polimorfismos en secuencias repetidas ricas en G-C (guanósina-citosina). Es una técnica de hibridación Southern Blot que utiliza la sonda específica de PGRS (un fragmento de 3,4 kb de la secuencia de PGRS) clonado en el plásmido pTBN12. Cuando se usa este plásmido sobre el ADN digerido previamente con *AluI* se puede, por una parte, distinguir cepas de casos de TB no relacionados o demostrar patrones de bandas idénticos en aislados de casos epidemiológicamente relacionados. Esta técnica se utilizó de forma exitosa en el genotipado de cepas de TB con menos de 5 copias de IS6110. A pesar de su poder de discriminación, es un método muy laborioso y que da lugar a patrones demasiado complejos para analizar, informatizar y normalizar (Ross *et al.*, 1992).

La técnica de análisis de los polimorfismos de nucleótidos únicos o Single Nucleotide Polymorfisms (SNPs) se basa en la detección de cambios nucleotídicos acumulados durante la evolución del bacilo. Habitualmente se usa una serie de paneles diagnósticos de SNPs en diferentes ámbitos de la epidemiología y de la microbiología clínica de la TB. Por ejemplo, muchas técnicas de detección genotípica de resistencias se basan en PCR a tiempo real para la detección de SNPs que se saben asociados a la resistencia a un determinado antibiótico. Usando otros paneles de SNPs podemos clasificar las cepas en linajes y familias y así podemos describir la estructura poblacional del bacilo a nivel local y global (Coll *et al.*, 2014). Al considerarse eventos

únicos en la evolución de *M. tuberculosis*, no reflejan homoplasias y, por ello, se considera que son marcadores ideales para clasificar aislados. Sin embargo, al estar restringido a unos pocos nucleótidos, el tipado de SNPs no se puede usar para medir la transmisión de la bacteria.

Por último, cabe resaltar que hoy en día los MIRUs es la técnica “gold-standard” de tipificación para epidemiología molecular. Sin embargo, las agencias de Salud Pública más potentes están empezando a usar el genoma completo de la bacteria como marcador epidemiológico. La ventaja de usar el genoma completo es que se consigue simultáneamente más resolución en los eventos de transmisión, una clasificación filogenética más robusta e información sobre marcadores de resistencia genotípicos. En el caso concreto de la epidemiología y la microbiología clínica, los genomas completos han permitido una mayor resolución para detectar casos de transmisión (Walker *et al.*, 2013), así como detectar nuevas mutaciones asociadas a resistencias a antibióticos (Walker *et al.*, 2015). Sin embargo, su aplicación rutinaria está lejos de ser adoptada más allá de las grandes agencias de Salud Pública. Aunque su coste es cada vez menor (alrededor de 100 euros en la actualidad), se requiere de experiencia tanto en técnicas genómicas como en bioinformática para sacarle el máximo partido a la información obtenida.

1.4.3.- Utilidad de las técnicas de epidemiología molecular

Como ya se ha comentado, el desarrollo y la aplicación de las técnicas de epidemiología molecular ha permitido un mejor conocimiento en la dinámica de la transmisión de la TB. Asimismo, se ha establecido como una herramienta complementaria para el ECC y también ha sido, y es muy útil, en la caracterización de las contaminaciones cruzadas en el laboratorio (Alcaide *et al.*, 2005).

1.4.3.1.- En el conocimiento de la transmisión de la enfermedad

A) Transmisión reciente de la tuberculosis

La aplicación de las técnicas de epidemiología molecular ha sido muy útil para la investigación de brotes y ha servido para mejorar nuestro conocimiento de la dinámica de la transmisión de la enfermedad. Se asume que la transmisión es reciente cuando las cepas recuperadas de diferentes casos muestran huellas genéticas idénticas o muy

similares. Éstos se denominan casos agrupados o *cluster*, mientras que los aislamientos de *M. tuberculosis* que muestran patrones únicos de ADN se considera, en general, que se debe a la reactivación de una infección adquirida en el pasado (Burgos *et al.*, 2004).

Un aspecto importante en los estudios poblacionales es la estabilidad del patrón genético de las cepas. Es necesario que cambie lo suficientemente rápido como para que las cepas sin ningún vínculo no tengan el mismo patrón y lo suficientemente lento como para que cepas que pertenecen a casos relacionados se mantengan iguales (Seidler *et al.*, 2004). Según diferentes estudios, se puede asumir que la vida media de un patrón de bandas, estudiado para el RFLP-IS6110, es de 2 a 8,7 años. Cabe señalar que este tiempo para que el ADN de *M. tuberculosis* se modifique progresivamente depende de diferentes factores tales como la eficacia del tratamiento, el intervalo entre el inicio de la enfermedad y el tratamiento y, probablemente, el predominio en cada zona de cepas más o menos estables (Yeh *et al.*, 1998; de Boer *et al.*, 1999; Warren *et al.*, 2002).

Basados en estas premisas, se han publicado numerosos estudios sobre la proporción de casos atribuibles a transmisión reciente. Hasta hace pocos años se consideraba que en los países con baja incidencia de TB la mayoría de enfermos correspondían a reactivación endógenas de infección ocurrida en el pasado. Sin embargo, la tipificación sistemática de amplias poblaciones ha evidenciado que las infecciones recientes son la causa de un número considerable de casos en estos países, oscilando de una sexta parte hasta casi la mitad (Alland, 1994; Small, 1994; Borgdorff, 1998; Pfyffer, 1998). Asimismo, en países de África y Asia, con elevada incidencia, se observa, además de una proporción importante de casos recientes, un número limitado de cepas circulantes responsables de la mayoría de los casos, lo que indicaría una tasa elevada de infección reciente y/o el predominio de determinadas cepas con una mejor adaptación o una mayor virulencia (Alcaide *et al.*, 2005).

Murray & Alland (2002) insisten en que los *cluster* deben interpretarse con precaución para estimar la verdadera carga de transmisión reciente de TB, debido a que la agrupación de casos varía dependiendo de las características del huésped y de la población. También, se debe tener en cuenta que, aparte de la transmisión reciente, diversos factores pueden dar lugar a patrones genotípicos similares, tales como la reactivación simultánea de una infección, con la misma cepa que se había adquirido

mucho antes, el predominio regional de una cepa que se ha difundido a lo largo de mucho tiempo (cepas endémicas) y también por un error de laboratorio (Glynn *et al.*, 1999). Se recomienda que para que la probabilidad de interpretar erróneamente un único patrón de ADN como una reactivación endógena sea mínima, el periodo abarcado en el estudio no debe ser menor de dos años (Murray & Alland, 2002).

B) Reinfeción exógena e infecciones mixtas

Por lo que se refiere a ésta, la tipificación molecular también ha aclarado dudas que se pudiera tener al respecto y se ha demostrado que son más frecuentes de lo que se pensaba, incluso en regiones con una incidencia relativamente baja de tuberculosis (Siedler *et al.*, 2004). La comparación de huellas de ADN de las cepas aisladas durante el primer y siguiente episodio ha demostrado que los pacientes no están totalmente protegidos de un posterior episodio de TB. Diversos estudios en Sudáfrica y Europa han demostrado que entre el 16 y el 75% de recidivas de la enfermedad se debían realmente a nuevas re infecciones (van Rie *et al.*, 1999; Bandera *et al.*, 2001). En nuestro país, Caminero *et al.* (2001a) pudieron realizar un análisis genotípico en muestras de 18 pacientes de los que se había obtenido cultivos positivos de *M. tuberculosis* con, al menos, 12 meses de diferencia. En el 44% de los casos, los genotipos fueron diferentes, lo que indicó reinfeción exógena. Otros autores, en un estudio de Madrid donde analizaban 43 casos con recurrencia de TB, pudieron demostrar que 14 (33%) de los casos se debía a una reinfeción exógena (García de Viedma *et al.*, 2002). Las técnicas de epidemiología molecular también han demostrado su utilidad en el diagnóstico de infecciones mixtas (Chaves *et al.*, 1999).

C) Transmisión de cepas resistentes

La tipificación también ha aportado información muy valiosa en la transmisión de cepas resistentes. Durante años se pensó que las cepas resistentes no se transmitían, o muy poco, basándose en la escasa proporción de casos secundarios en el entorno de pacientes con TB resistente. Estudios epidemiológicos moleculares en los Países Bajos y en San Francisco mostraron que los casos con aislamientos resistentes a isoniazida se agrupaban de un 30 a un 80% menos que los casos con aislamientos sensibles (van Soolingen *et al.*, 1999; Burgos *et al.*, 2003). Resultados similares se mostraron en estudios de casos con cepas de *M. tuberculosis* MR en México y Sudáfrica, donde las

cepas resistentes tenían de un 70% a 80 % menos de probabilidad de transmitirse que las cepas sensibles (García-García *et al.*, 2000; Goodfrey-Faussett *et al.*, 2000).

Los estudios donde se mostraba una reducción de la transmisión de la enfermedad eran predominantemente casos con cepas resistentes a isoniazida con mutaciones en el gen *katG* y pérdida de la acción catalasa. Actualmente se sabe que la pérdida de transmisibilidad de las cepas resistentes es un fenómeno complejo con multitud de matices. De la información disponible se deduce que probablemente tengan disminuida la capacidad de transmisión las cepas resistentes a isoniazida con CMI's elevadas (>1µg/ml) y con alteraciones múltiples en el gen *katG* o en genes no conocidos, mientras que las cepas con CMI's bajas y mutaciones, sobretodo en el gen *inhA* (Pym *et al.*, 2001; Pym *et al.*, 2002), mantendrían gran parte o la totalidad de la capacidad de transmisión. No obstante, pueden hallarse cepas que se comportan de diferente manera, como es el caso del genotipo Beijing y su variante "W", que a pesar de ser MR en muchos casos se transmite de forma similar a las cepas sensibles (Bifani *et al.*, 1999).

D) Transmisión de cepas más virulentas

Tradicionalmente se consideraba que las distintas cepas de *M. tuberculosis* tenían una virulencia similar. Sin embargo, los estudios moleculares han permitido demostrar la existencia de un pequeño porcentaje que causan un número desproporcionadamente grande de casos, lo que permite suponer que algunas cepas son más virulentas o bien más transmisibles (Barnes & Cave, 2003). Un ejemplo de este fenómeno lo constituye la familia de *M. tuberculosis* denominada Beijing/W. La cepa de genotipo Beijing se ha visto implicada en grandes brotes descritos en Estados Unidos, Asia, Europa del Este y la Federación Rusa (Bifani *et al.*, 1999). El predominio de las cepas Beijing en muchas regiones puede indicar que tienen una ventaja selectiva sobre otras cepas. Caminero *et al.* (2001b) describen que en la isla de Gran Canaria se produjo una rápida diseminación de ésta desde un único paciente hasta llegar a representar, en 4 años, el 27,1% de los aislamientos de *M. tuberculosis*. Estas cepas muestran una mayor capacidad para replicarse en los macrófagos humanos y éste podría ser el mecanismo para su mayor propagación (Zhang *et al.*, 1999). Sin embargo, este tipo de hallazgos puede deberse no sólo a una mayor virulencia del germen, sino también a la distinta inmunogenicidad, a distinta transmisibilidad, a un

crecimiento diferente o a características de la población expuesta (Murray & Alland, 2002).

1.4.3.2.- En el estudio de contactos y en los programas de control de la TB

Como ha sido señalado, la epidemiología molecular es una herramienta complementaria muy útil para el ECC. Sin embargo, estos métodos no son mutuamente sustituibles, ya que cada una de ellos analiza eventos distintos. El ECC investiga la infección de personas entorno a un caso y la búsqueda de casos secundarios que se producen simultáneamente en el tiempo, mientras que la tipificación abarca periodos más amplios y únicamente puede considerar los casos que han evolucionado a enfermedad (Alcaide *et al.*, 2005). Es por ello que la epidemiología molecular tiende a relacionar casos con infección que no había evidenciado la epidemiología clásica (Small *et al.*, 1994; Barnes *et al.*, 1997; Weis *et al.*, 2002). Jasmer *et al.* (1999) refieren, en un estudio realizado en la ciudad de San Francisco, que gracias a la implementación de técnicas de epidemiología molecular se pudo multiplicar por 3 el número de contactos identificados por cada caso nuevo de TB. Por otro lado, Iñigo *et al.* (2003), en un estudio en el que aplicaron un método de captura-recaptura combinando la epidemiología clásica y la molecular, refieren una excelente mejora en la detección de casos relacionados con la transmisión reciente en Madrid.

Cabe señalar que no siempre se encuentra una explicación congruente a la relación de casos que son detectados por la tipificación y que no lo habían sido por el ECC. Éstos pueden ser debidos a contactos no conocidos y a la reactivación en el mismo período de casos infectados en épocas diferentes y que no expresarían transmisión reciente. No obstante, la aplicación de estas técnicas ha aportado información de gran interés a ese respecto, ya que se ha visto que la transmisión tras contactos esporádicos es más frecuente de lo que se pensaba y que en algunos pacientes, dependiendo de sus hábitos sociales, la transmisión en el ámbito familiar no sería la más importante (Barnes & Cave, 2003).

Además, la información que se obtiene tras la aplicación de las técnicas de epidemiología molecular resulta muy útil para evaluar los resultados de los programas de control de la enfermedad. En concreto, Jasmer *et al.* (1999) describen que, durante el periodo comprendido entre 1991 y 1997 en la ciudad de San Francisco, el número de casos agregados en *cluster*, o lo que es lo mismo el número de casos de

transmisión reciente, había disminuido considerablemente. Este hecho hacía pensar que las medidas de control adoptadas habían permitido disminuir la diseminación de la TB.

La necesidad de la implementación de las técnicas de tipificación se puede observar en las evaluaciones epidemiológicas que se llevan a cabo en algunos países y que permiten diseñar políticas específicas contra la TB. Es importante distinguir si la enfermedad se debe a una infección reciente o a la reactivación de una infección latente. Si los casos por infección reciente son significativos, deben intensificarse las medidas de búsqueda de casos y del correcto tratamiento. Por el contrario, si la infección latente es la causa principal, los esfuerzos serán destinados a aplicar medidas para prevenir la reactivación (Geng *et al.*, 2002).

1.4.3.3.- En la caracterización de contaminaciones cruzadas en el laboratorio

Estas técnicas son también de gran ayuda para los laboratorios de Microbiología, ya que cuando se sospechan posibles contaminaciones en el procesamiento de las muestras, permiten demostrar, con certeza, si éstas han ocurrido o no.

Aunque en el estudio referido por Ruddy *et al.* (2002) realizado en Londres sólo se detectó un 0,93% de falsos positivos por contaminación cruzada en el laboratorio, algunos autores sugieren que hasta un 3% de los cultivos positivos de *M. tuberculosis* corresponden a contaminaciones cruzadas (Alonso *et al.*, 2007).

Detectar las contaminaciones tiene una elevada transcendencia clínica, ya que evita instaurar tratamientos inadecuados y permite que se realicen exploraciones diagnósticas de procesos alternativos que pueden ser la verdadera causa de la enfermedad del paciente (Burman & Reves, 2000). Las rutinas de los laboratorios de micobacterias deben estar diseñadas para poder detectar fácilmente las posibles contaminaciones que se pueden dar en el laboratorio.

La posibilidad de una contaminación de laboratorio debe sospecharse cuando la tinción de las muestras ha sido negativa, cuando se aísla *M. tuberculosis* únicamente en una de varias muestras y con crecimiento escaso, cuando se observan varias muestras positivas en un corto período de tiempo y cuando la clínica no apoya el diagnóstico de TB (Narayanan, 2004). En estos casos, la tipificación de los aislamientos puede confirmar o descartar las sospechas. Si el genotipo de la cepa de dudosa

significación clínica se corresponde con el de otra cepa manipulada simultáneamente en el laboratorio se confirmará la contaminación cruzada (Burman & Reves, 2000).

2.- OBJETIVOS

Aunque la TB sigue siendo la segunda causa de mortalidad, después del SIDA, causada por un agente infeccioso, en los últimos años, a nivel mundial, se viene observando un descenso progresivo en el número de casos. En España, la tasa de incidencia ha disminuido de 17,9 casos por cada 10^5 habitantes en el año 2003 a 13,1 casos por cada 10^5 habitantes en el año 2012. En la mayoría del resto de los países de la Región Europea también ha ocurrido este fenómeno: en Francia ha disminuido de 8,8 a 4,3 por cada 10^5 habitantes; en Alemania de 8,7 a 4,5; y en Italia de 7,9 a 2,8 casos por cada 10^5 habitantes.

En la Comunidad Valenciana también se ha podido observar esta tendencia decreciente, pasando de una tasa de 17 por 10^5 habitantes en año 2003 a 9,9 por 10^5 habitantes en el año 2012.

El Hospital General Universitario de Castellón (HGUC) es el hospital de referencia de la provincia de Castellón y en el Servicio de Microbiología se realiza el diagnóstico microbiológico de la TB de los Departamentos de Salud de Vinaroz y Castellón y de dos centros penitenciarios. Además se centraliza el estudio de sensibilidad de todos los casos de TB de los 3 Departamentos de Salud de la provincia.

Los objetivos del presente estudio han sido:

- conocer la evolución de la TB en la provincia de Castellón a lo largo del periodo comprendido entre enero de 2008 y diciembre de 2012, con la finalidad de ver si se ha producido la tendencia decreciente observada a nivel mundial, en Europa, España y en la Comunidad Valenciana;
- describir las características clínico-epidemiológicas y microbiológicas de los casos diagnosticados con cultivo positivo de TB en ese mismo periodo;
- detallar la frecuencia de resistencias de *M. tuberculosis* frente a fármacos tuberculostáticos de primera línea;
- y describir los patrones de transmisión de TB en Castellón durante los años 2010, 2011 y 2012 mediante tipificación molecular, utilizando la técnica 15-loci MIRU-VNTR por primera vez en nuestra provincia.

Para poder abordar estos objetivos, la presente Tesis Doctoral se ha dividido en los siguientes apartados:

Objetivos

- en el apartado de material y métodos, se describirá las fuentes de información consultadas para recuperar los casos de TB declarados/diagnosticados y para conocer sus características clínico-epidemiológicas. Los materiales y metodología utilizadas para llevar a cabo el diagnóstico de los casos, el estudio de sensibilidad y la caracterización molecular de las cepas, así como todo lo relacionado con el tratamiento de datos utilizados en el presente trabajo;
- el siguiente apartado se destina a mostrar los resultados obtenidos y a su análisis;
- posteriormente se dedica un capítulo a la discusión de los resultados, contrastándolos con los logrados por otros autores en estudios similares;
- a continuación se expone las conclusiones más relevantes que se desprenden del estudio realizado;
- y ya por último, se recoge todas y cada una de las referencias bibliográficas que han sido utilizadas en el momento de la redacción de esta Tesis Doctoral.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- El Hospital General Universitario de Castellón

El Hospital General Universitario de Castellón (HGUC) es el centro hospitalario de referencia de la provincia de Castellón. Dispone de 580 camas y presta asistencia sanitaria a 280.336 habitantes pertenecientes al Departamento de Salud de Castellón. Es el hospital de referencia del Hospital Comarcal de Vinaroz que asiste a una población de 89.914 habitantes pertenecientes al Departamento de Salud de Vinaroz, y del Hospital de la Plana, que presta asistencia a 186.630 habitantes del Departamento de Salud de la Plana.

En el Servicio de Microbiología del HGUC se realiza el diagnóstico microbiológico y el estudio de sensibilidad de la TB del Departamento de Salud de Castellón, que incluye dos centros penitenciarios, y del Departamento de Salud de Vinaroz. Asimismo, centraliza el estudio de sensibilidad de los casos de TB diagnosticados en los tres Departamentos de Salud de la provincia. El diagnóstico de TB de una pequeña parte de la provincia, englobada en el Departamento de Salud de Sagunto, se realiza en el hospital de Sagunto.

3.2.- Fuentes de información

La primera parte de esta Tesis Doctoral aborda un estudio retrospectivo realizado con el fin de conocer la evolución de la TB en Castellón, en el que se analizan las características epidemiológicas, clínicas y microbiológicas de los pacientes con cultivo positivo de la provincia, así como la frecuencia de las resistencias de todas las cepas de *M. tuberculosis* en el periodo comprendido entre Enero de 2008 y Diciembre de 2012.

Para poder llevar a cabo los tres primeros objetivos se consultaron diferentes fuentes de información, como son: el Sistema de Información del Laboratorio (SIL), que en el servicio de Microbiología de nuestro hospital es, desde julio del 2007, el Gestlab; el Sistema de Análisis de la Vigilancia Epidemiológica (AVE); y los Informes de Tuberculosis de la Comunidad Valenciana.

3.2.1.- Sistema de Información del Laboratorio

Para recopilar los casos diagnosticados con cultivo positivo de la provincia se consultó el Sistema de Información del Laboratorio (SIL) Gestlab. De éste se pudo obtener información de cada paciente en relación al: sexo, edad, localización de la TB,

diagnóstico microbiológico (baciloscopia, cultivo y PCR) y la sensibilidad de las cepas aisladas.

3.2.2.- Sistema de Análisis de la Vigilancia Epidemiológica

La información recogida del SIL se cotejó, tras eliminar los casos desplazados de otras provincias, con la base de datos del Sistema de Análisis de la Vigilancia Epidemiológica (AVE). Este sistema recoge los datos aportados por los profesionales que realizan su actividad en el ámbito de la asistencia sanitaria, los de la Red de Vigilancia Microbiológica (RedMiva) y la de los profesionales de la vigilancia epidemiológica que realizan el ECC recogiendo información de los pacientes (Ver Anexo 1).

La definición de caso para su inclusión en este registro es la siguiente: paciente con baciloscopia positiva a quien se le pautó tratamiento antituberculoso, o tiene cultivo positivo para *M. tuberculosis*, y a aquellos con tratamiento antituberculoso durante un tiempo superior a 3 meses, o menos si se les retira por efectos secundarios, o si fallecen (Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat, 2009).

Al cotejar los datos del SIL de los pacientes con cultivo positivo con los datos del AVE hemos podido recoger la información en relación a: Departamento de Salud al que pertenecen, sexo, edad, nacionalidad, si eran casos nuevos o tratados previamente, si requirieron ingreso, factores de riesgo (VIH, alcoholismo, diabetes, neoplasia, ADVP, tabaquismo) y, por último, el lugar físico donde viven habitualmente o su situación social (residencia de ancianos, centro penitenciario, indigente, otras).

Además, a través del ECC pudimos conocer todos los posibles contactos de los casos de TB y establecer probables agrupaciones (*clusters*) que posteriormente se confirmarían o no con la segunda parte de este estudio, que se basa en la tipificación molecular de las cepas de *M. tuberculosis* aisladas durante los años 2010, 2011 y 2012.

3.2.3.- Informes de Tuberculosis de la Comunidad Valenciana

También se consultaron los informes de TB de la Comunidad Valenciana, editados por la Dirección General de Salud Pública (Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013), que resumen la actividad de la vigilancia

epidemiológica de la TB en la Comunidad Valenciana durante el año anterior a cuando son editados. Dichos informes describen los casos de TB declarados en ese año en relación a:

- la frecuencia de la TB en la Comunidad Valenciana en cada uno de los Departamentos de Salud, en las tres provincias, y en aquellas ciudades de más de 50.000 habitantes;
- los factores de riesgo y la patología asociada a la enfermedad tuberculosa;
- el estudio de sensibilidad de las cepas de *M. tuberculosis* aisladas;
- y los estudios de contactos de los casos de TB declarados durante el año.

3.3.- Diagnóstico microbiológico y estudio de sensibilidad

3.3.1.- Diagnóstico microbiológico

Una vez se recibieron las muestras en el Servicio de Microbiología, se comprobó que los datos administrativos eran correctos y que las muestras cumplían con los criterios de aceptación. Se introdujeron los datos en el SIL y las muestras se llevaron a la Sección de Micobacterias donde al día siguiente fueron procesadas en bloque.

3.3.1.1.- Procesamiento primario

Previamente a la siembra del cultivo y a la realización de la extensión para su posterior tinción, y con el fin de eliminar la flora acompañante que podría interferir en el crecimiento de la micobacteria y de concentrar el inóculo micobacteriano, a la mayoría de las muestras en las que se solicitó estudio de micobacterias se les realizó un pretratamiento (homogeneización, descontaminación y concentración) basado en el método de Kubica *et al.* (1963). Esta técnica se fundamenta en la combinación de dos reactivos: a) el hidróxido sódico (NaOH) al 2%, que sirve como descontaminante por sus propiedades alcalinas; y b) la N-acetil-L-cisteína, que actúa como mucolítico, siendo imprescindible para la disgregación de la matriz orgánica de la muestra y liberación de los microorganismos. No se realizó este procesamiento previo en los líquidos estériles y en las muestras de orina, en cuyo caso sólo se concentraron mediante centrifugación.

Para llevar a cabo el pretratamiento, se añadieron a los 10 mL de muestra introducidos previamente en un tubo cónico de 50 mL (BD Falcon™ Tube, Becton Dickinson), unos 10 mL de BBL™ MycoPrep™ (Becton Dickinson) que es un reactivo que lleva hidróxido sódico (NaOH) y N-acetil-L-cisteína (NALC) dentro de una ampolla de vidrio sellada en el interior de la solución. Una vez realizada la mezcla, se cerró bien el tubo cónico y se homogeneizó con el *vortex* (Heidolph Reax-2000, Comecta S.A) durante 30 segundos. Se mantuvo 20 minutos a temperatura ambiente para generar el proceso de descontaminación. Una vez transcurrido ese tiempo, se añadió a la mezcla unos 30 mL de solución de parada tampón fosfato BBL MycoPrep (BD) para frenar la acción del NaOH y posteriormente se centrifugó a 5.000 rpm durante 20 minutos (Heraeus Biofuge *Stratos*, Thermo Scientific). Tras la centrifugación, se decantó el sobrenadante y se reservó el sedimento para su posterior cultivo y realización de extensión para tinción.

3.3.1.2.- Cultivo y baciloscopia

Una vez descontaminadas y concentradas las muestras, del sedimento obtenido se realizó una extensión para teñirla posteriormente con tinción de auramina-rodamina (Tec-Laim S.A.). Posteriormente, se introdujeron 0,2 mL en el medio sólido Lowenstein-Jensen (BBL™ Lowenstein-Jensen, Becton Dickinson) y 0.5 mL en el medio líquido Middlebrook 7H9 (BBL MGIT, Becton Dickinson) suplementado previamente con BD BACTEC™ MGIT™ 960 supplement kit (Becton Dickinson). Este kit está compuesto por una mezcla antibiótica liofilizada (BBL™ MGIT™ PANTA™, Becton Dickinson) con los siguientes antimicrobianos: polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprina y azlociclina; y con un caldo de enriquecimiento, el OADC (BACTEC™ MGIT Growth Supplement, Becton Dickinson), que está constituido por la mezcla de albúmina bovina, dextrosa, estearato de poliosietileno, catalasa y ácido oleico. Antes de utilizarse como suplemento para los tubos MGIT, se reconstituye un tubo del liofilizado de PANTA con 15 mL del caldo de OADC. Los tubos de Lowenstein-Jensen se incubaron durante un periodo de 42 días en una estufa a 37°C, procediendo a su lectura una vez por semana para comprobar la presencia de crecimiento, y los tubos MGIT se incubaron en el sistema automático para el cultivo y antibiograma de micobacterias BACTEC™ MGIT™ 960 System (Becton Dickinson). Este sistema realiza lecturas cada hora y detecta cuando hay crecimiento en un tubo por consumo de oxígeno, ya que los

tubos MGIT contienen una matriz, que emite fluorescencia cuando no hay o disminuye la concentración de oxígeno.

Las extensiones, tras tinción con auramina, se observaron con el microscopio de fluorescencia (Axioskop 2 plus, Carl Zeiss) y se informó su resultado según la nomenclatura de los CDC: 1+ (1-9 bacilos por 100 campos), 2+ (1-9 bacilos por cada 10 campos), 3+ (1-9 bacilos por campo) y 4+ (>9 bacilos por campo). En caso de no observar BAAR, se informó como negativo.

3.3.1.3.- Identificación de las cepas

Cuando se detectó crecimiento en los medios de cultivo, primero se comprobó la ausencia de contaminación bacteriana mediante una extensión y posterior tinción con Ziehl Neelsen (Tec-Laim S.A.) y resiembra en agar chocolate PolyVitex (Bio Merieux). En el caso de observar BAAR, la identificación de las micobacterias se realizó hasta finales del año 2009 con un kit comercial de hibridación de ADN (Accu Probe SYSTEM, GEN-PROBE^R), el cual utiliza una sonda de ADN que hibrida con el ARN ribosomal específico de *M. tuberculosis* complex. A partir de esa fecha, la identificación se realizó mediante detección del antígeno MPT 64 (BD MGIT TBc Identification Test, Becton Dickinson). Es una prueba de inmunocromatografía que se basa en una reacción de anticuerpos monoclonales contra el antígeno MPT64, una de las proteínas secretadas por *M. tuberculosis* complex cuando está en cultivo.

3.3.1.4.- Diagnóstico mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa

En el Servicio de Microbiología se implantó, desde Junio de 2009, una técnica de diagnóstico rápido de TB basada en Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a tiempo real, se trata del ensayo Xpert MTB/RIF, que se realiza con el sistema GeneXpert (Cepheid, EEUUy FIND Diagnostics, Suiza). Se trata de un método revolucionario puesto que reduce a la mínima expresión la manipulación de la muestra y por tanto el riesgo de transmisión cruzada ya que integra en un solo cartucho la extracción de ADN, la amplificación genética y la detección por hibridación con sondas a tiempo real (*molecular beacons*). La diana de amplificación que utiliza es la región *core* del gen *rpoB*, que es la región determinante de la resistencia a la rifampicina, con lo que este sistema permite detectar a la vez ADN de *M. tuberculosis* complex y la detección rápida de mutaciones relacionadas con la resistencia a la rifampicina.

Para poder llevar a cabo el ensayo, la muestra del paciente se trata con un reactivo (*sample reagent*), especialmente formulado para inactivar la micobacteria, licuarla y estabilizar los componentes. Posteriormente, la mezcla se vortea, se deja reposar 15 minutos y se vuelve a vortear. De esta mezcla, ya inocua, se introduce un pequeño volumen de 2 mL en el cartucho, donde ya hemos dicho que se encuentran todos los componentes necesarios para realizar el análisis, y se coloca en el sistema. El tiempo de respuesta que se consigue con el Xpert MTB/RIF es de 2 horas.

3.3.2.- Estudio de sensibilidad

Se le realizó el estudio de sensibilidad frente a los cinco fármacos de primera línea [isoniazida (H), rifampicina (R), estreptomycin (S), etambutol (E) y pirazinamida (P)] al primer aislamiento de cada paciente. Éste se realizó con el sistema BD kit BACTEC MGIT 960 SIRE y con BD kit BACTEC MGIT 960 PZA (BD), y se introdujeron en el sistema automático para el cultivo y antibiograma de micobacterias BACTEC™ MGIT™ 960 System (Becton Dickinson). Se trata de un análisis cualitativo en el que se obtienen los resultados en unos 4 a 13 días, basado en la comparación de crecimiento de la cepa aislada de *M. tuberculosis* en los tubos que contienen los tuberculostáticos con el crecimiento del tubo sin fármaco (control de crecimiento). Cuando se detectó alguna resistencia a cualquiera de los fármacos de primera línea, primero se comprobó, y en caso de confirmarse, se envió al Centro Nacional de Microbiología, donde se realizó la identificación y el estudio de sensibilidad a fármacos de primera y segunda línea. El estudio de sensibilidad se repitió cuando el paciente no evolucionaba favorablemente con el esquema de tratamiento inicial y se sospechó fracaso terapéutico (Caminero, 2003).

Cuando se detectó alguna resistencia, y según los datos que constaban en las encuestas de cada caso, se clasificó ésta como: resistencia en pacientes sin tratamiento previo (antiguamente denominada inicial o primaria), definida como la que se presenta desde un inicio debido a que la cepa transmitida era portadora ya de mutaciones relacionadas con resistencia antibiótica; y resistencia en pacientes previamente tratados (antiguamente denominada secundaria o adquirida), definida como la que aparece una vez se ha recibido tratamiento farmacológico durante al menos un mes, normalmente debido a una mala administración del mismo

(combinación insuficiente de fármacos, tratamiento intermitente no controlado o tiempo insuficiente) (Farga & Caminero, 2011).

3.4.- Mantenimiento de los aislados y recuperación

3.4.1.- Mantenimiento de los aislados

Una vez realizado el estudio de sensibilidad, se congelaron las cepas (una por cada paciente) a -80° C. Los aislados se suspendieron en 750 μ L de solución acuosa de glicerol (Guinama, Valencia) al 10% (v/v) (Tison & Carbonelle, 1972) en tubos *ependorf* de 0.2 mL (0.2 mL ThermoTube, ABgene, Epsom, Surrey), con el fin de poderlos recuperar cuando se necesitara para cualquier estudio posterior.

3.4.2.- Recuperación de las cepas

Para llevar a cabo el estudio de epidemiología molecular, se intentaron recuperar las cepas congeladas pertenecientes a los casos de TB con cultivo positivo diagnosticados en los años 2010, 2011 y 2012. Con el fin de comprobar la viabilidad de los aislados seleccionados, se llevó a cabo su descongelación e inoculación en un tubo de medio líquido Middlebrook 7H9 (BBL MGIT, Becton Dickinson), suplementado con 0.8 mL de OADC (suplemento de crecimiento BACTEC MGIT, Becton Dickinson) y en 2 tubos de Löwenstein-Jensen (Becton Dickinson), que se incubaron como se ha comentado anteriormente en el apartado del cultivo.

Posteriormente, en caso de no obtener crecimiento en los medios Löwenstein-Jensen a las 2 semanas, se realizaron subcultivos a partir del MGIT en 2 tubos de Löwenstein-Jensen que fueron incubados en estufa de 37° C y atmósfera convencional durante unas 3-4 semanas hasta tener un número de colonias suficientes para realizar la extracción de ADN. Una vez crecidas y diferenciadas las colonias, se procedió a corroborar la pureza de los cultivos mediante observación macroscópica y microscópica con tinción de Ziehl-Neelsen, tras lo cual se prepararon réplicas de los cultivos en glicerol (Guinama) al 10% (v/v) que fueron conservadas a -80° C.

3.5.- Tipificación molecular de los aislados

3.5.1.- Extracción del ADN

Una vez se obtuvo suficiente crecimiento, la extracción del ADN se llevó a cabo mediante un procedimiento de lisis térmica (Allix *et al.*, 2004; Doig *et al.*, 2002), para lo cual: i) dos asas bacteriológicas bien cargadas con biomasa procedente del cultivo en Lowénstein-Jensen se suspendieron en 1 mL de agua estéril en un tubo *ependorf* de 0.2 mL etiquetado correctamente con la identificación de cada cepa; ii) se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 minutos (Heraerus Microcentrifuge, Thermo Scientific); iii) se eliminó el sobrenadante y se reservó el pellet; iv) el pellet se resuspendió con 450 μ L de TE pH 8 (10mM Tris-HCl, Merck; 1mM EDTA Sigma-Aldrich Co); v) la mezcla se homogeneizó con *vortex* (Heidolph Reax-2000, Comecta S.A) hasta conseguir disgregar todo lo posible las colonias; vi) la suspensión fue inactivada por calor a 90° C durante 30 minutos en un bloque térmico (Accublock™, Labnet); vii) se volvió a centrifugar a 13.000 r.p.m durante 5 minutos; y por último viii) se recuperó el sobrenadante y se dispensó en otro tubo *ependorf* también rotulado correctamente con los datos de la cepa. El DNA extraído fue almacenado en un congelador a -20°C hasta su posterior análisis.

3.5.2.- Análisis de la calidad del ADN

Para evaluar la calidad del ADN elegimos 20 muestras. Se preparó un gel de agarosa al 0.8% P/V (Conda/Pronadisa) en buffer TBE 1X pH 8, (Tris (hidroxymethyl) aminomethane, Applichen/Panreac; ácido bórico, Applichem/Panreac; EDTA 0.5 M VWR/Prolabo) y con la ayuda de un peine se realizaron 20 pocillos. Se tomó 1 μ L de ADN con 9 μ L de buffer de carga. El tampón de carga se había preparado añadiendo a 60 mL de TBE 10X pH=8,0, 0.125 ml de azul de bromofenol (Merck), 0.125 mL de xilencianol (Applichen) y 30 mL de glicerol (VWR, Prolabo). La electroforesis se realizó en una cubeta para 20 muestras (Real Comb 20 Sample MC, Durviz) a 120 voltios durante 40 minutos (Fuente de alimentación Real 300V/700MA/150W, Durviz).

3.5.3.- Amplificación mediante PCR de 15 loci MIRU

Para caracterizar e identificar genéticamente los aislados clínicos, se utilizó un set de 15 loci MIRU-VNTR (4, 26, 40, 10, 16, 31, 424, 577, 2165, 2401, 3690, 4156,

2163b, 1955 y 4052) diseñados por Supply (2005). Se realizaron 5 PCR multiplex con el fin de analizar 5 grupos de 3 loci simultáneamente siguiendo el protocolo propuesto por Supply (2005) con las modificaciones propuestas por Alonso-Rodríguez *et al.* (2009a). Los tamaños de los productos de la PCR se analizaron en un secuenciador de DNA automatizado por electroforesis capilar (ABI Prism 3730, Applied Biosystems). Cuando no se consiguió obtener un resultado aceptable por secuenciación, se realizó la amplificación de cada locus por separado y se analizaron los productos mediante electroforesis en geles de agarosa. Este último procedimiento se explicará más adelante con detalle.

PCR MULTIPLEX	LOCUS	ALIAS	LONGITUD DE LA UNIDAD DE REPETICIÓN (pb)	SECUENCIAS DE LOS PARES DE CEBADORES
MIX 1	580	MIRU 4/ ETR-D	77	GCGCGAGAGCCCCGAAGTGC (FAM) GCGCAGCAGAAACGCCAGC
	2996	MIRU 26	51	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCCGAATAG (VIC)
	802	MIRU 40	54	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT (NED) GGGTGATCTCGGCCAAATCAGATA
MIX 2	960	MIRU 10	55	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT (FAM)
	1644	MIRU 16	53	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC (VIC)
	3192	MIRU 31	53	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT (NED)
MIX 3	424	VNTR 42	51	CTTGCCCGGCATCAAGCGCATTATT GGCAGCAGAGCCCGGATTCTTC (FAM)
	577	VNTR 43/ ETR C	58	CGAGAGTGGCAGTGGCGTTATCT (VIC) AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA
	2165	ETR A	75	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT (NED) CGAAGCCTGGGGTGCCCGGATTT
MIX 4	2401	VNTR 47	58	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT (FAM) ACTTGAACCCCCACGCCATTAGTA
	3690	VNTR 52	58	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC (VIC) TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG
	4156	VNTR 53/ QUB-4156	59	TGACCACGGATTGCTCTAGT GCCGGCGTCCATGTT (NED)
MIX 5	2163b	QUB-11b	69	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGGCAT (FAM)
	1955	VNTR 1955	57	AGATCCCAGTTGTCGTCGTC (VIC) CAACATCGCCTGGTTCTGTGA
	4052	QUB-26	111	AACGCTCAGCTGTCGGAT (NED) CGGCCGTGCCGCCAGGTCTTCCCAGT

Tabla 1: Secuencias de los cebadores (*primers*) de cada uno de los loci MIRUs y longitud de cada unidad de repetición. Se indica en cada par el cebador marcado y el fluoróforo empleado en el marcaje.

Para cada PCR multiplex, se marcó un cebador de cada par (*forward y reverse*) con un colorante fluorescente específico. Sin embargo, cuando se realizó el análisis de los productos de la PCR usando electroforesis en gel de agarosa, se utilizaron los mismos oligonucleótidos no marcados (IDT, Integrated DNA Technologies).

En la Tabla 1 se muestra la designación de cada locus, la longitud de cada repetición y la secuencia de los cebadores utilizados para la PCR. Éstos se utilizaron a una concentración de 10 µM, excepto los del locus 53 que fue de 20 µM.

3.5.3.1.- Amplificación mediante PCR multiplex

La reacción de amplificación se realizó en una placa para PCR de 96 pocillos de media faldilla (Cultek), que se identificó correctamente con la fecha, indicándose la posición de cada muestra y de cada una de las 5 reacciones de PCR multiplex (Mix1, Mix2, Mix3, Mix4, Mix5). En cada placa de reacción se incluyó un control positivo (H37Ra) y uno negativo (agua ultrapura, MilliQ) (Figura 11).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M 1 MIX1	M 2 MIX1	M 3 MIX1	M 4 MIX1	M 5 MIX1	M 6 MIX1	M 7 MIX1	M 8 MIX1	M 9 MIX1	M 10 MIX1	C- MIX1	H37Ra MIX1
B	M 1 MIX2	M 2 MIX2	M 3 MIX2	M 4 MIX2	M 5 MIX2	M 6 MIX2	M 7 MIX2	M 8 MIX2	M 9 MIX2	M 10 MIX2	C- MIX2	H37Ra MIX2
C	M 1 MIX3	M 2 MIX3	M 3 MIX3	M 4 MIX3	M 5 MIX3	M 6 MIX3	M 7 MIX3	M 8 MIX3	M 9 MIX3	M 10 MIX3	C- MIX3	H37Ra MIX3
D	M 1 MIX4	M 2 MIX4	M 3 MIX4	M 4 MIX4	M 5 MIX4	M 6 MIX4	M 7 MIX4	M 8 MIX4	M 9 MIX4	M 10 MIX4	C- MIX4	H37Ra MIX4
E	M 1 MIX5	M 2 MIX5	M 3 MIX5	M 4 MIX5	M 5 MIX5	M 6 MIX5	M 7 MIX5	M 8 MIX5	M 9 MIX5	M 10 MIX5	C- MIX5	H37Ra MIX5
F	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
G	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
FECHA REACCION PCR												

Figura 11: Modelo de placa para la PCR multiplex.

El volumen final de cada reacción fue de 50 µL, siendo 45 µL de *mastermix* y 5 µL de muestra con el DNA problema. El kit comercial utilizado fue QIAGEN Multiplex PCR

Kit (1000) (Qiagen) que contiene: i) la QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (compuesta por la HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen), los dNTPs, el tampón (Multiplex PCR buffer) y MgCl₂ 25mM), ii) la solución Q y iii) agua ultrapura (RNase-Free Water).

Los volúmenes de los reactivos (en µL) utilizados para realizar las PCR multiplex son los que se indican en la Tabla 2.

REACTIVOS	MIX 1			MIX 2			MIX 3			MIX 4			MIX 5		
	4	26	40	10	16	31	42	43	ETRA	47	52	53	Qub11b (2163b)	1955	Qub26
Primer -1	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	2	1,25	1,25	1,25
Primer -2	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	2	1,25	1,25	1,25
Qi PCR mMIX		25						25			25			25	
Q solution		5						5			5			5	
H ₂ O ultrapura		7,5						7,5			6			7,5	

Tabla 2: Tabla de reactivos PCR multiplex 15 MIRU-VNTR.

Una vez realizadas las diluciones en cada pocillo con la *mastermix* y la muestra, antes de introducir la placa en el termociclador, se selló con film de aluminio para placas de 96 pocillos (Corning, VWR) que también se identificó correctamente.

Para llevar a cabo la reacción de amplificación, se definieron en el termociclador (Mastercycler® Pro, Eppendorf) las condiciones de PCR esquematizadas en la Tabla 3.

CICLOS	TEMPERATURAS	TIEMPO
1X	95° C	15 minutos
20X	94° C	1 minuto
	59° C	1 minuto
	72° C	1:30 minuto
	72° C	10 minutos
1X	8 ° C	Indefinido

Tabla 3: Condiciones de temperatura, nº de ciclos y tiempo para la reacción de PCR multiplex.

En caso de no realizarse seguidamente el análisis por secuenciación de los productos de la amplificación, la placa se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.5.3.2.- Amplificación mediante PCR individuales

Como ya se ha comentado, cuando la tipificación del aislado o el número de repeticiones de algún MIRU no se pudo conseguir con PCR multiplex y posterior secuenciación por electroforesis capilar, está se obtuvo mediante PCR de cada locus MIRU y posterior análisis de los productos mediante electroforesis en gel de agarosa. Se utilizó una placa de 96 pocillos, que se identificó correctamente con la fecha y los números de muestra. Se incluyó un control positivo H37Ra y un control negativo (agua ultrapura milliQ). El volumen final de cada reacción fue de 50 µL, siendo 45 µL de *mastermix* (44,8 µL del MIX indicado en la tabla+ 0,2 µL de Taq HotStart Qiagen) y 5 µL de muestra con el DNA problema. El kit comercial utilizado fue HotStarTaq® DNA Polymerase (Qiagen) KIT que contiene: i) la HotStarTaq DNA Polymerase 5Units/µL (Qiagen); ii) el tampón (PCR buffer 10X); iii) MgCl₂ 25mM); iv) la solución Q 5X; y v) agua ultrapura (milliQ). Y por otra parte se utilizaron los dNTPs a una concentración de 5mM (Promega). Los volúmenes de los reactivos (en µL), *stocks* con cantidades calculadas para 20 muestras, son los que se indican en la Tabla 4.

REACTIVOS MIX	4	26	40	10	16	31	42	43	ETRA	47	52	53	Qub11b (2163b)	1955	Qub26 (4052)
Primer -1 (100 µM)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Primer -2 (100 µM)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
BUFFER (10X)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MgCl ₂ 25mM	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
dNTPs 5mM	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Q 5x	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
AGUA ultrapura	526	526	526	526	526	526	526	526	526	526	526	526	526	526	526

Tabla 4: Reactivos para PCR simple, con cantidades calculadas para 20 muestras.

Las condiciones de PCR definidas en el termociclador (Mastercycler® pro, Eppendorf) para la PCR individual fueron las indicadas en la Tabla 5.

CICLOS	TEMPERATURAS	TIEMPO
1X	95° C	15 minutos
35X	94° C	1 minuto
	59° C	1 minuto
	72° C	1:30 minuto
1X	72° C	10 minutos
1X	8 °C	Indefinido

Tabla 5: Condiciones de temperatura, nº de ciclos y tiempo para la reacción de PCR individual para posterior análisis con gel de agarosa.

Habida cuenta de que no se obtuvo resultados para el MIRU 4156, ni utilizando la electroforesis capilar ni con electroforesis en gel de agarosa, con los cebadores definidos en las tablas correspondientes, se revisó la bibliografía y se constató la existencia de problemas para la obtención de los resultados para ese MIRU (de Beer *et al.*, 2012, 2014). Así que, se decidió utilizar la pareja de cebadores siguientes, de la misma marca comercial que los anteriores descritos (IDT, Integrated DNA Technologies).

4156-F	GAT GTG CGG TAC GTG ATC
4156-R	TGA CCA CGG ATT GCT CTA GTC

3.5.3.3.- Medición del producto amplificado tras PCR multiplex

Una vez finalizada la reacción de PCR, se midió el DNA obtenido tras amplificación con el fluorímetro portátil (QuantiFluor™ Single Tube, Promega), utilizando el kit PicoGreen (Invitrogen-Molecular Probes), de la siguiente manera (medimos sólo la concentración de DNA de la primera fila de la placa de 96 pocillos, asumiendo que en el resto de reacciones se obtuvieron concentraciones similares): i) se realizó una dilución en un tubo *eppendorf* de 1 µL de la muestra de la placa de PCR en 24 µL de TE 1X (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH7.5); ii) en un tubo *eppendorf* se preparó la

cantidad necesaria de PicoGreen, diluido a 1:200 en TE 1X, para medir el DNA de 12 muestras como indica el kit; iii) se añadió a la muestra diluida unos 25 µL de fluoróforo diluido y se incubó a temperatura ambiente y a la oscuridad durante 3 minutos y; iv) transcurrido ese tiempo se procedió a medir en el fluorímetro con la ayuda de unos tubos capilares (Minicell Adapter Cuvettes, Promega).

Una vez obtuvimos la concentración de DNA de las 12 muestras, realizamos una media de todas ellas, siempre y cuando fueran similares. Si por el contrario había alguna muestra cuya concentración de DNA era muy diferente, se ajustaba por separado. La concentración media obtenida se ajustó con agua ultrapura (MilliQ) a 2,5 ng/µL en volumen final de 10 µL. Esta dilución se realizó en una placa de 96 pocillos rotulada correctamente como "PLACA DILUCIÓN POST-PCR (FECHA)".

3.5.4.- Secuenciación mediante electroforesis capilar

3.5.4.1.- Preparación de la placa para el secuenciador

Preparamos un *mix* con 9 µL de formamida (Applied Biosystem) y 0,3 µL de GeneScan™-1200 Liz ® Size Standar (Applied Biosystem) por cada muestra. De este *mix*, dispensamos 9 µL en otra placa de 96 pocillos de media faldilla (Cultek) adaptada para el secuenciador de DNA automatizado por electroforesis capilar (ABI Prism 3730, Applied Biosystem). Seguidamente, se dispensó 1 µL de muestra de la "PLACA DILUCIÓN POST-PCR" con la ayuda de una pipeta multicanal. En los pocillos donde no había muestra, se dispensaron 10 µL de agua.

La sellamos con un film de aluminio para placa de 96 pocillos (Corning, VWR) y se centrifugó con el fin de que la muestra y el *mix* formamida-liz se mezclaran y se dispusieran en el fondo de cada pocillo. La placa se almacenó a -20° C hasta que se secuenció. Como se recomienda en el protocolo, una vez realizada la mezcla formamida-liz-DNA no se almacenó más de una semana.

La placa se envió a la Sección de Genómica del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (Universitat de València). Para ello, se rellenó previamente una plantilla (véase modelo en el anexo 2) indicando la posición de cada muestra en la placa e identificamos la placa de la siguiente manera: primero el año, luego el mes y luego el día _TB. Así pues, la placa del día 26 de junio del 2014, se llamaría 140626_TB.

La secuenciación fue llevada a cabo mediante electroforesis capilar con un secuenciador automático de DNA ABI Prism 3730, Applied Biosystems.

3.5.4.2.- Análisis de los productos obtenidos

Los cromatogramas obtenidos para cada locus MIRU fueron analizados con el programa GeneMapper v 4.0. (Applied Biosystems) para asignar el tamaño de los alelos. Este programa realiza la identificación de los fragmentos de interés y el cálculo de su tamaño en nucleótidos, así como la altura y el área de los picos. Además identifica los alelos correspondientes a estos picos, mostrándonos la información de forma gráfica.

Una vez obtenidos los tamaños de los alelos del locus MIRU analizado, éstos fueron convertidos a un código numérico. Esta conversión está disponible en el manual "Multilocus Variable Numbers of Tandem Repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates" (de Beer & van Soolingen, 2012) (véase anexo 3).

3.5.5.- Electroforesis en gel de agarosa

Después de la amplificación mediante PCR simple para un locus MIRU de un determinado número de muestras, se procedió a su análisis mediante electroforesis en gel de agarosa.

Para poder llevarla a cabo, se preparó un gel de agarosa al 2% P/V (Conda/Pronadisa), en buffer TBE 1X pH=8,0 ((Tris (hidroxymethyl) aminomethane, Applichen/Panreac; ácido bórico, Applichem/Panreac; EDTA 0.5 M VWR/Prolabo). Se pesaron 2,4 g de agarosa y se diluyeron en 120 mL de TBE 1X; se calentó hasta ebullición, con el fin de disolver totalmente la agarosa; se dejó enfriar ligeramente y se añadieron 4 µL de Gel Red™ (Biotium) para poder visualizar correctamente los tamaños de las bandas de ADN. Se vertió en la cubeta en la que se había colocado un peine para dar lugar a 20 pocillos. Una vez se hubo solidificado el gel de agarosa, se retiró el peine y se colocó en la cubeta de electroforesis (Real Comb 20 sample, Durviz) que previamente se había llenado con tampón TBE 1X para que cubriera todo el gel. Con el fin de poder medir el DNA, se dispensó, con la ayuda de una micropipeta en el primer y en el último pocillo, 3 µL de un marcador de peso molecular (PM) de 100 pb (DNA Ladder Mix, GeneRuler, Thermo Scientific); y en el resto de pocillos, la mezcla de 2 µL de tampón de carga y 4 µL de muestra (de esta mezcla sólo se dispensó en cada

pocillo 5 µL). El tampón de carga se había preparado añadiendo a 60 mL de TBE 10X pH=8,0, 0.125 mL de azul de bromofenol (Merck), 0.125 mL de xilencianol (Applichen) y 30 mL de glicerol (VWR, Prolabo). Una vez se dispensó todas las muestras, se tapó la cubeta y se puso en marcha la electroforesis seleccionando una corriente eléctrica de 110 Voltios durante 2 horas (Fuente de alimentación Real 300V/700MA/150W, Durviz).

3.5.5.1.- Análisis de los tamaños obtenidos

Tras finalizar ese tiempo de migración, y con la finalidad de visualizar los tamaños de los amplicones, los geles fueron depositados en un transiluminador de luz ultravioleta (Vilber Lourmat) y las imágenes fueron fotografiadas mediante un sistema de captación de imágenes (DC290 Zoom Digital Camera, Eastman Kodak Company) que permitía visualizarlas en un monitor (Rainbow CCTV RMB92), en donde se podía guardar en una tarjeta de memoria para posteriormente analizarlas con detalle. Para determinar el número de repeticiones en tándem de cada locus MIRU, o lo que es lo mismo el PM de los productos de PCR evidenciados en cada gel de electroforesis, se comparó la altura de la banda obtenida con el marcador de PM. Primero, se analizó la cepa control H37Ra y se comprobó que los tamaños de los fragmentos eran los esperados para ésta. Al igual que se hizo con la electroforesis capilar, el tamaño de cada MIRU-locus se convirtió a un número (número de repeticiones) basándonos en el Manual "Multilocus Variable Numbers of Tandem Repeats Typing of *M. tuberculosis* complex isolates" donde se encuentra descrita la correspondencia entre el PM y el número de repeticiones de cada locus (de Beer & van Soolingen, 2012).

El número de repeticiones esperadas para cada locus MIRU-VNTR de la cepa control H37Rv/H37Ra se muestra en la Tabla 6 y su código MIRU de 15 dígitos sería: 243132253233552.

MIRU 04	MIRU 26	MIRU 40	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 31	VNTR 42	VNTR 43	ETR-A	VNTR 47	VNTR 52	VNTR 53	QUB-11b	VNTR 1955	QUB-26
3	3	1	3	2	3	2	4	3	2	5	2	5	2	5

Tabla 6: N° de repeticiones esperadas de la cepa control H37Ra para cada loci MIRU-VNTR.

3.5.6.- Análisis de los genotipos obtenidos

3.4.6.1.- Genotipos

Una vez calculado el número de repeticiones de cada locus MIRU-VNTR, bien tras electroforesis capilar o bien por electroforesis en gel de agarosa, los resultados obtenidos, es decir el código numérico de cada cepa, se recogió en una base de datos elaborada en hojas de cálculo de Excel 2010. El código numérico de cada uno de los genotipos fue analizado usando el portal de internet MIRU-VNTR *plus*.

<http://www.miru-vnrplus.org/MIRU/index.faces>

Con la finalidad de conocer el número de *clusters* (genotipos idénticos) y de patrones únicos de transmisión (genotipos únicos) se utilizó una herramienta de la web que se denomina árbol de mínima expansión. Este árbol muestra la relación entre los genotipos de *M. tuberculosis*; la longitud de las ramas indica la cantidad de alelos diferentes; y los círculos representan el número de aislados agrupados o no. Dependiendo del tamaño y de la intensidad del color de cada círculo, éstos incluirán más o menos aislados. Cuanto mayor sea el círculo, y más intenso el color de éste, más cepas estarán incluidas en el *cluster*.

Como se ha comentado con anterioridad, se consideran genotipos únicos aquellos que están representados por un solo aislado y los *clusters* se definen como dos o más aislados de diferentes pacientes que presentan el mismo genotipo. Los *cluster* se consideran resultado de una transmisión reciente, mientras que los genotipos únicos pertenecen a reactivaciones de infecciones de TB latentes (Small *et al.*, 1994).

3.4.6.2.- Tasa de transmisión

La tasa de transmisión se calculó a partir del número de aislados en *cluster*, menos el número de *clusters* y todo ello dividido entre el número total de aislados (Small *et al.*, 1994; Nabyonga *et al.*, 2011).

3.4.6.3.- Poder de discriminación de la técnica

El poder discriminatorio de un método de tipificación es su capacidad para distinguir entre cepas no relacionadas genéticamente entre sí (Hunter & Gaston, 1988). Para su cálculo, se aplicó el índice de diversidad de Hunter-Gaston (D ó HGDI) para cada locus MIRU-VNTR (Hunter & Gaston, 1988; Dillon *et al.*, 1993).

El índice viene dado por la siguiente ecuación:

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

Donde "N" es el número total de cepas en el estudio; "s" es el número total de *clusters* obtenidos; y "n_j" es el número de aislados por *cluster*. El HGDI ó D varía entre 0.00 y 1.00; de manera que un valor de 0.00 indica que todos los aislados son indistinguibles, y un valor de 1.00 indicaría que todos los aislados en la muestra se diferencian.

Los loci que presentaron un valor de HGDI > 0,6 se clasificaron como altamente discriminantes. Los que presentaron valores entre $\geq 0,3$ y $\leq 0,6$ como de moderado poder de discriminación y finalmente, los de valores < 0,3 se clasificaron como de bajo poder de discriminación (Sola *et al.*, 2003).

4.- RESULTADOS

4.1.- Resultados obtenidos a partir de las fuentes de información

Las tasas de incidencia de TB registradas en la provincia de Castellón fueron 18 por 10⁵ habitantes en 2008; 15,3 por 10⁵ en 2009; 12,8 por 10⁵ en 2010; 10,3 por 10⁵ en 2011; y de 9,6 por 10⁵ en 2012 (Conselleria de Sanitat, Generalitat Valenciana, 2009, 2010, 2011, 2012 y 2013).

En los tres Departamentos de Salud de la provincia analizados se declararon 387 casos de TB: 101 casos en el año 2008; 91 en 2009; 76 en el 2010; 61 en el 2011; y 58 casos en el año 2012.

El número de casos y las tasas de incidencia por Departamento de Salud y por año, se distribuyeron tal y como se recoge en la Tabla 7.

	2008		2009		2010		2011		2012		Total	
	Nº	Tasa	Nº	Tasa								
Vinaroz	17	20,4	17	19,7	10	11,1	9	9,9	14	15,4	67	15,3
La Plana	30	17,1	18	10,0	26	14,0	32	10,7	18	10,1	124	12,4
Castellón	54	20,1	56	20,5	40	14,1	20	11,1	26	9,0	196	14,9

Tabla 7: Distribución de casos de TB y tasas por 10⁵ habitantes por Departamento de Salud de la provincia de Castellón y por año.

Durante este periodo se diagnosticaron 320 pacientes con cultivo positivo que representaban el 82,7% de los casos declarados. En el año 2008 se diagnosticaron 74 casos, 83 en el 2009, 66 en 2010, 56 en 2011 y 41 en el año 2012. El 43,7% de los pacientes eran extranjeros (140/320) y la mayoría procedía de Rumanía (57,4%, 80/140), Marruecos (21,4%, 30/140) y Colombia (3,6%, 5/140).

En la Tabla 8 se describe la distribución de los casos por año de estudio, diferenciando nacionales de extranjeros. Durante los 5 años analizados, se puede constatar cómo ha ido disminuyendo el número total de casos de TB a partir del año 2009, tanto en españoles (46 casos en 2009 y 23 en 2012) , como en extranjeros (37 casos en 2009 y 18 en 2012).

AÑO	Nº CASOS	ESPAÑOLES	%	EXTRANJEROS	%
2008	74	44	59,5	30	40,5
2009	83	46	55,4	37	44,6
2010	66	32	48,5	34	51,5
2011	56	35	62,5	21	37,5
2012	41	23	56,1	18	43,9
TOTAL	320	180	56,3	140	43,7

Tabla 8: Distribución de casos españoles y extranjeros por año del estudio en la provincia de Castellón.

En la Tabla 9 se detalla la distribución del origen de los extranjeros por año de estudio, englobando en el norte de África los casos procedentes de Marruecos y de Argelia. En los del Centro y Sudamérica, se incluye los casos de Perú, Colombia, Brasil y Ecuador, mientras que en "otras nacionalidades" se incluye los nacidos en Ucrania, Italia, Alemania, Pakistán y China.

AÑO	RUMANÍA	%	NORTE AFRICA	%	CENTRO Y SUR AMERICA	%	OTRAS	%
2008	19	63	6	20	2	6,7	3	10
2009	22	59,4	12	32,4	2	5,4	1	2,7
2010	16	47,1	9	26,5	5	14,7	4	11,8
2011	13	61,9	5	23,8	1	4,8	2	9,5
2012	10	55,5	3	16,7	4	22,2	1	5,6
TOTAL	80	57,1	35	25,1	14	10	11	7,9

Tabla 9: Distribución de casos extranjeros por origen y por año de estudio en la provincia de Castellón.

En cuanto a la distribución por sexo, cabe decir que fue más frecuente en hombres, representando el 65% (208/320) de casos, que en las mujeres que fue de un 35%, (112/320), siendo la razón hombre/mujer de 1,9. Si se analiza año a año, se observa

como predomina siempre el sexo masculino: 70,3% en el año 2008; 69,9% en el 2009; 53% en el 2010; 67,9% en el 2011; y de un 61% en el 2012.

La edad media de los pacientes fue de 32,4 años (rango etario: 0-91). Un 4,6% (15/320) eran menores de 14 años; un 60,6% (194/320) tenían entre 15 y 44 años; un 22,5% (72/320) entre 45 y 64 años; y, el 12,2 % (39/320) eran mayores de 65 años. La distribución por sexo, edad y año del estudio se recoge en la Tabla 10.

AÑO	SEXO (N/%)		EDAD (N/%) AÑOS								
	H	M	0-4	5-14	15-24	25-34	35-44	45-54	55-64	65-74	>75
2008	52 (70,3)	22 (29,7)	4 (5,4)	1 (1,3)	7 (9,6)	14 (18,9)	27 (36,5)	12 (16,2)	2 (2,7)	3 (4,1)	4 (5,4)
2009	58 (69,9)	25 (30,1)	4 (4,8)	0	11 (13,2)	16 (19,3)	22 (26,5)	16 (19,3)	2 (2,4)	7 (8,4)	5 (6)
2010	35 (53)	31 (47)	2 (3)	0	13 (19,7)	16 (24,2)	13 (19,7)	10 (15,1)	6 (9,1)	3 (4,5)	3 (4,5)
2011	38 (67,9)	18 (32,1)	0	1 (1,8)	4 (7,1)	14 (25)	13 (23,2)	13 (23,2)	3 (5,4)	3 (5,4)	5 (8,9)
2012	25 (61)	16 (39)	2 (4,9)	1 (2,4)	2 (4,9)	13 (31,7)	9 (21,9)	5 (12,2)	3 (7,3)	3 (7,3)	3 (7,3)
TOTAL	208 (65)	112 (35)	12 (3,7)	3 (0,9)	37 (11,6)	73 (22,8)	84 (26,2)	56 (17,5)	16 (5)	19 (5,9)	20 (6,2)

Tabla 10: Distribución de número de casos y porcentaje de TB por sexo, grupo de edad y por año de estudio en la provincia de Castellón.

En relación a los pacientes que habían recibido tratamiento, el 93,8% (300/320) de los pacientes eran casos no tratados previamente.

En relación a los factores de riesgo (FR) para el desarrollo de enfermedad tuberculosa, el 36,6% (117/320) de los casos presentaba al menos uno: alcoholismo, tabaquismo, diabetes, neoplasia, usuarios de drogas por vía parenteral (UDVP) o infección por VIH. El FR más frecuente fue el alcoholismo, solo o asociado a otros, con un 17,2% (55/320), seguido de la infección por el VIH 7,8% (25/320), bien como única predisposición o junto con otra. El tabaquismo, se recogió en el 7,2% (23/320) de los casos y la diabetes en el 5% (16/320). Un 6,6% (21/320) de los pacientes presentaron dos FR, destacando la combinación VIH+UDVP con 6 (1,9%) casos; y en 5 (1,6%) pacientes coincidían hasta 3 FR a la vez (VIH+Alcoholismo+UDVP) (Tabla 11).

	ALCOHOLISMO	TABAQUISMO	DIABETES	NEOPLASIA	UDVP	VIH	ALCOHOLISMO+ NEOPLASIA	ALCOHOLISMO+ UDVP	ALCOHOLISMO+ DIABETES	VIH+ NEOPLASIA	VIH+ UDVP	VIH+ DIABETES	VIH+UDVP+ ALCOHOLISMO	TOTAL
2008	11	19	2	1	0	3	0	2	0	1	2	2	1	44 (59,5)
2009	14	2	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	20 (24,1)
2010	9	2	1	0	1	3	0	0	0	0	1	0	2	19 (28,8)
2011	1	0	5	2	1	1	3	2	1	0	3	0	1	21 (37,5)
2012	4	0	3	1	0	2	1	0	0	1	0	0	1	13 (31,7)
TOTAL %	39 (12,2)	23 (7,2)	12 (3,7)	5 (1,6)	2 (0,6)	10 (3,1)	5 (1,6)	4 (1,2)	1 (0,3)	2 (0,6)	6 (1,9)	2 (0,6)	5 (1,6)	117 (36,6)

Tabla 11: Distribución de casos con factores de riesgo de TB por año de estudio.

El 45,6% (146/320) eran población de riesgo: indigentes, inmigrantes (extranjeros con estancia inferior a 5 años), personal sanitario, presos, ancianos institucionalizados, o colectividades. En este grupo de población, la TB se dio con mayor frecuencia en inmigrantes 17,5% (56/320), seguido de indigentes con un 15% (48/320). Los presos sólo representaron el 5,3% del total (17/320) (Tabla 12).

	INDIGENTE	INMIGRANTE	PERSONAL SANITARIO	PRESOS	RESIDENCIA DE ANCIANOS	COLECTIVIDA -DES	TOTAL
2008	7	20	0	4	2	3	36 (48,6)
2009	10	20	0	1	1	3	35 (42,2)
2010	16	11	2	5	1	3	38 (57,6)
2011	11	4	1	3	1	3	23 (41,1)
2012	4	1	1	4	1	3	14 (34,1)
TOTAL	48 (15)	56 (17,5)	4 (1,25)	17 (5,3)	6 (1,8)	15 (4,7)	146 (45,6)

Tabla 12: Distribución de la población de riesgo por año de estudio.

El número de pacientes hospitalizados fue de 215 (67,2%): 52 (70,3%) en el año 2008; 55 (66,3%) en el 2009; 45 (68,2%) en el 2010; 37 (66,1%) en el 2011; y, por último, 26 (63,4%) en el año 2012.

En cuanto a las formas clínicas, el 87,2% (279/320) presentaba TB pulmonar y el 12,8% (41/320) extrapulmonar (EP). La forma clínica predominante dentro de las TB EP fue la ganglionar, con un 5,9% (19/320), seguida de la pleural y la genitourinaria, ambas con un 2,5% (8/320). Hubo un bajo porcentaje de TB osteoarticular (0,9%, 3/320) y de TB miliar (0,6%, 2/320), y tan sólo se diagnosticó un caso de TB intestinal y otro peritoneal. No se diagnosticó ningún caso de meningitis tuberculosa.

Si analizamos las características de los pacientes con TB EP, observamos que un 51,2% eran mujeres y que es muy poco frecuente en población infantil (un caso). El 53,6% de los casos se englobó dentro del grupo de edad de entre los 25 y 54 años, mientras que el 26,8% eran mayores de 65 años. El 51,2% eran de nacionalidad española; el 29,3% marroquí; el 9,7% rumana; y el resto de otras nacionalidades.

A partir del ECC, se sospecharon 7 posibles agrupaciones: cada brote estaba formado por 2 miembros.

Nº BROTE	ÁMBITO	RELACIÓN	SEXO	EDAD (años)	NACIONALIDAD	Nº CEPA	AÑO AISLAMIENTO
870	Familiar	Hermanos	V	16	PERUANA	50	2010
			M	15	PERUANA	11	2010
885	Familiar	Madre e hija	M	25	RUMANA	13	2010
			M	0	ESPAÑOLA	15	2010
1027	Familiar	Matrimonio	V	53	MARROQUÍ	62	2010
			M	43	MARROQUÍ	18	2011
1079	Familiar	Hermanos	V	40	ESPAÑOLA	26	2011
			V	32	ESPAÑOLA	32	2010
1180	Comunitario	Amigos	M	26	BRASILEÑA	1	2012
			M	4	COLOMBIANA	4	2012
1274	Familiar	Amplio círculo	V	41	RUMANA	15	2012
			M	1	RUMANA	30	2012
1294	Familiar	Padre e hija	M	32	ESPAÑOLA	13	2012
			V	66	ESPAÑOLA	31	2012

Tabla 13: Características de los brotes obtenidos tras el ECC y datos relevantes de los casos.

Todos ellos se dieron dentro del ámbito familiar, excepto uno en el que la relación era de amigos. De los 14 casos agrupados, 5 eran españoles y 9 extranjeros. Uno de los brotes se consideró de agrupación mixta, al estar formado por una madre de nacionalidad rumana y su hija de 6 meses nacida en España. En la Tabla 13 se muestran las características de los brotes definidos por el ECC y de los casos que los forman.

4.2.- Resultados sobre el diagnóstico microbiológico

4.2.1.- Resultado de la baciloscopia

De los 320 casos diagnosticados con cultivo positivo en la provincia de Castellón, el resultado de la baciloscopia fue positivo en el 60,6% (194/320) de los pacientes. Si lo analizamos según la forma clínica, observamos que ésta fue mayoritariamente positiva en las formas pulmonares, siendo un 66,3% (185/279), mientras que en las extrapulmonares lo fue en un 17,1% (7/41). La distribución del resultado de la baciloscopia, según la forma clínica y año de estudio, se puede observar en la Tabla 14.

BACILOSCOPIA +	TOTALES	%	TB PULMONAR	%	TB EXTRAPULMONAR	%
2008	47	63,5	45	70,3	2	20
2009	50	60,2	50	65,8	0	0
2010	34	51,5	31	57,4	3	25
2011	34	60,7	32	68,1	2	22,2
2012	27	65,8	27	71,1	0	0
TOTAL	194	60,6	185	66,3	7	17,1

Tabla 14: Distribución del resultado de la baciloscopia según forma clínica y por año de estudio.

4.2.2.- Resultado de la PCR

Desde la implantación de la técnica de PCR en nuestro laboratorio, en junio del 2009, se realizó ésta a 69 pacientes (69/320). Se analizaron 60 muestras respiratorias (60/279) resultando 54 positivas, y 9 muestras extrapulmonares (9/41), siendo positivas 6.

4.3.- Resultados del estudio de sensibilidad

El estudio de sensibilidad frente a los fármacos de primera línea se realizó a las 320 cepas aisladas. Se detectó *M. tuberculosis* resistente a cualquier fármaco (DR-TB) en el 13,5% (41/320) de los aislados. Todas las DR-TB fueron casos que no habían sido tratados previamente (inicial o primaria).

En el año 2008 hubo un 5,4% (4/74) de cepas resistentes; un 10,8% (9/83) en el año 2009; 18,2% (12/66) en el 2010; 16,1% (9/56) en el 2011; y finalmente 17,1% (7/41) en el 2012.

En los 5 años analizados, la resistencia global a isoniazida (H) fue de un 8,1% (26/320), siendo en un 50% (13/26) en población extranjera. En el año 2008 hubo un 4% (3/74) de cepas resistentes a H; en el 2009 fue de un 7,2% (6/83); en el 2010 del 16,7% (11/66); en el 2011 del 7,1% (4/56); y en el 2012 de un 4,9% (2/41).

La combinación de resistencia a H y a estreptomina (S) se observó en 11 (3,4%) casos. No se detectó ninguna cepa extremadamente resistente (TB-XDR), ni ninguna con resistencia aislada a etambutol (E).

Del total de las cepas resistentes, el 51,2% (21/41) presentó resistencia a un solo fármaco; el 31,7% (13/41) a 2 fármacos; y el 17,1% (7/41) a más de 2 fármacos. Cabe destacar que en el año 2008, 2009, 2010, 2012 se aislaron 1 (1,3%), 3 (3,6%), 2 (3%) y 1 (2,4%) cepas multirresistentes (TB-MR) respectivamente, lo que resultó el 2,2% (7/320) del total, presentando 6 de estas cepas resistencia a los 5 fármacos de primera línea (1,9%).

La distribución de las resistencias a los fármacos antituberculosos de primera línea y por año de estudio está indicada de forma detallada en la Tabla 15.

RESISTENCIAS	GLOBALES (%)	ISONIAZIDA (H)	ESTREPTOMICINA(S)	RIFAMPICINA (R)	PIRAZINAMIDA (P)	H+S	H+R+S	H+R+S+E+P	S+P	ISONIAZIDA TOTAL (%)
2008	4 (5,4)	1	1	0	0	1	0	1	0	3 (4)
2009	9 (10,8)	2	3	0	0	1	1	2	0	6 (7,2)
2010	12 (18,2)	2	0	1	0	7	0	2	0	11 (16,7)
2011	9 (16,1)	2	1	1	2	2	0	0	1	4 (7,1)
2012	7 (17,1)	1	3	0	1	0	0	1	1	2 (4,9)
TOTALES (%)	41 (13,5)	8 (2,5)	8 (2,5)	2 (0,6)	3 (0,9)	11 (3,4)	1 (0,3)	6 (1,9)	2 (0,6)	26 (8,1)

Tabla 15: Distribución de resistencias a los fármacos antituberculosos de primera línea y por año de estudio.

El porcentaje de resistencia en la población española fue del 10,6% (19/180) y en extranjeros del 15,7% (22/140). La distribución de las resistencias por año de estudio y nacionalidad fue del 4,5% en españoles vs 6,7% en extranjeros durante el año 2008; del 10,9% vs 10,8% en el 2009; 12,5% vs 23,5% en 2010; 14,1% vs 14,3% en el 2011; y del 8,7% vs 27,8% en el año 2012 (Tabla 16).

AÑO	ESPAÑOLES % (n/N)	EXTRANJEROS % (n/N)	TOTAL % (n/N)
2008	4,5 (2/44)	6,7 (2/30)	5,4 (4/74)
2009	10,9 (5/46)	10,8 (4/37)	10,8 (9/83)
2010	12,5 (4/32)	23,5 (8/34)	18,2 (12/66)
2011	14,1 (6/35)	14,3 (3/21)	16,1 (9/56)
2012	8,7 (2/23)	27,8 (5/18)	17,1 (7/41)
TOTAL	10,6 (19/180)	15,7 (22/140)	13,5 (41/320)

Tabla 16: Porcentajes de casos resistentes por año y nacionalidad.

Del total de las DR-TB, un 53,7% (22/41) fue en extranjeros y un 46,3% (19/41) en españoles. De los extranjeros con DR-TB, 6 (14,6%) eran marroquíes; 6 (14,6%) procedían de Centro y Sudamérica; 5 (12,2%) eran rumanos; y 5 (12,2%) de otras nacionalidades.

4.4.- Resultados del polimorfismo genético mediante 15 MIRU-VNTR

De las 163 cepas que habían sido aisladas durante el periodo comprendido entre enero de 2010 y diciembre de 2012 se pudieron recuperar 151 (92,6%): 85 (56,3%) pertenecían a pacientes españoles y 66 (43,7%) a casos de nacionalidad extranjera. Estas 151 cepas se tipificaron mediante un set de 15 loci MIRU-VNTR, lo que supuso la realización de 2.265 determinaciones.

Mediante electroforesis capilar, se pudo obtener resultado en 1.760 (77,7%) de los análisis realizados, mientras que a partir de electroforesis en gel de agarosa se obtuvo en 503 (22,2%), y únicamente en 2 (0.09%) loci no se consiguió resultado.

En la Tabla 17 se puede observar el número de resultados obtenidos para cada locus-MIRU a partir de electroforesis capilar y a partir de electroforesis en gel de agarosa.

Los loci que fallaron más con electroforesis capilar fueron: el VNTR 4052, con un 77,9%; el MIRU 42; con un 32,5%; y el VNTR 4156, en el que no se consiguió ningún resultado con dicha técnica.

Los resultados obtenidos con la electroforesis capilar para el VNTR 4156 fueron realmente desesperanzadores. No se logró determinar el número de repeticiones para dicho MIRU-VNTR en ninguna cepa, pese a las mejoras ensayadas aumentando las concentraciones de la muestra, de los cebadores y de los reactivos de la PCR multiplex. Para lograr resultados en la tipificación de este VNTR, se tuvieron que rediseñar los cebadores basándonos en el trabajo publicado por de Beer *et al.* (2014) y se realizaron las repeticiones de las PCR individuales que se analizaron con electroforesis en gel de agarosa.

SET	LOCUS	Electroforesis capilar N (%)	Electroforesis en gel de agarosa N (%)	No resultado N (%)
1	MIRU 4-580	151 (100)	-	-
2	MIRU 26-2996	128 (84,8)	23 (15,2)	-
3	MIRU 40-802	140 (92,7)	11 (7,3)	-
4	MIRU 10-960	147 (97,3)	4 (2,7)	-
5	MIRU 16-1644	139 (92,0)	12 (8,0)	-
6	MIRU 31-3192	144 (95,4)	7 (4,6)	-
7	MIRU 42-424	102 (67,5)	49 (32,5)	-
8	VNTR 577	129 (85,4)	22 (14,6)	-
9	VNTR 2165	128 (84,8)	23 (15,2)	-
10	VNTR 2401	147 (97,3)	4 (2,7)	-
11	VNTR 3690	140 (92,7)	11 (7,3)	-
12	VNTR 4156	-	150 (99,3)	1 (0,7)
13	VNTR 2163b	109 (72,2)	41 (27,1)	1 (0,7)
14	VNTR 1955	112 (74,2)	39 (25,8)	-
15	VNTR 4052	44 (29,1)	107 (70,9)	-
TOTAL		1760 (77,7)	503 (22,2)	2 (0,09)

Tabla 17: Número de resultados obtenidos mediante electroforesis capilar y en gel de agarosa para cada locus.

El número de alelos detectados por locus varió de 2 en el MIRU 4, a 10 en el VNTR 52, resultando este último el más polimórfico en nuestro estudio. El poder de discriminación de la técnica, calculado mediante el índice de HGDI, fue de un 0.998. La diversidad alélica, o HGDI de cada MIRU, varió de 0,05 en el MIRU 4 a 0,83 en el VNTR 4052. Los MIRU 26, 40 y 10, y los VNTR 577, 2401, 3690, 2163b, 1955 y 4052 mostraron un elevado poder discriminante. Los MIRU 16, 31 y 42, y los VNTR 2165 y 4156 presentaron un moderado poder de discriminación. Finalmente, el MIRU 4, con un HGDI de 0.05, presentó una baja capacidad discriminante (Tabla 18).

DIVERSIDAD GENÉTICA	LOCUS (MIRU / VNTR)	Nº DE ALELOS	HGDI
	MIRU 4-580	2	0,05
	MIRU 26-2996	9	0,67
	MIRU 40-802	6	0,73
	MIRU 10-960	6	0,72
	MIRU 16-1644	4	0,57
	MIRU 31-3192	4	0,36
	MIRU 42-424	6	0,57
	VNTR 577	5	0,66
	VNTR 2165	5	0,56
	VNTR 2401	4	0,62
	VNTR 3690	8	0,70
	VNTR 4156	3	0,54
	VNTR 2163b	8	0,76
	VNTR 1955	6	0,62
	VNTR 4052	10	0,83

Tabla 18: Nº de alelos y diversidad alélica para cada MIRU-VNTR.

Los pesos moleculares (PM) para los loci 1955 y 2163b de algunos aislados, y su correspondencia con el número de repeticiones, obtenido a partir de electroforesis en gel de agarosa, se muestran en las Figuras 12 y 13.

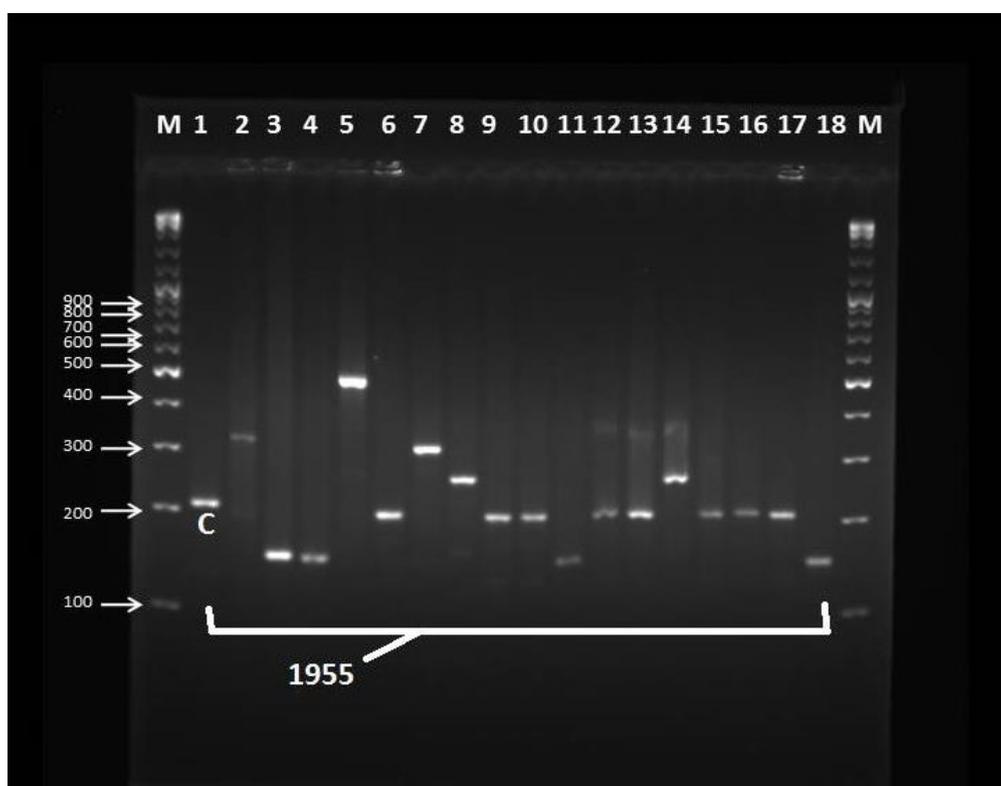


Figura 12: Imagen gel electroforesis agarosa de locus 1955. **M:** Marcador de peso molecular; **Carril 1:** Cepa control H37Ra, PM: 203, 2 copias MIRU, **Carril 2:** Cepa 8-2011, PM: 309, 4 copias MIRU; **Carril 3:** Cepa 9-2011, PM: 149, 1 copia MIRU; **Carril 4:** Cepa 13-2011, PM: 149, 1 copia MIRU; **Carril 5:** Cepa 16-2011, PM: 472, 7 copias MIRU; **Carril 6:** Cepa 21-2011, PM: 203, 2 copias MIRU; **Carril 7:** Cepa 30-2011, PM: 309, 4 copias MIRU; **Carril 8:** Cepa 41-2011, PM: 256, 3 copias MIRU; **Carril 9:** Cepa 48-2011, PM: 203, 2 copias MIRU; **Carril 10:** Cepa 54-2011, PM: 203, 2 copias MIRU; **Carril 11:** Cepa 3-2010, PM: 149, 1 copia MIRU; **Carril 12:** Cepa 10-2010, PM: 203, 2 copias MIRU; **Carril 13:** Cepa 13-2010, PM: 203, 2 copias MIRU; **Carril 14:** Cepa 14-2010, PM: 256, 3 copias MIRU; **Carril 15:** Cepa 15-2010, PM: 203, 2 copias MIRU; **Carril 16:** Cepa 23-2010, PM: 203, 2 copias MIRU; **Carril 17:** Cepa 24-2010, PM: 203, 2 copias MIRU; **Carril 18:** Cepa 27-2010, PM: 149, 1 copia MIRU.

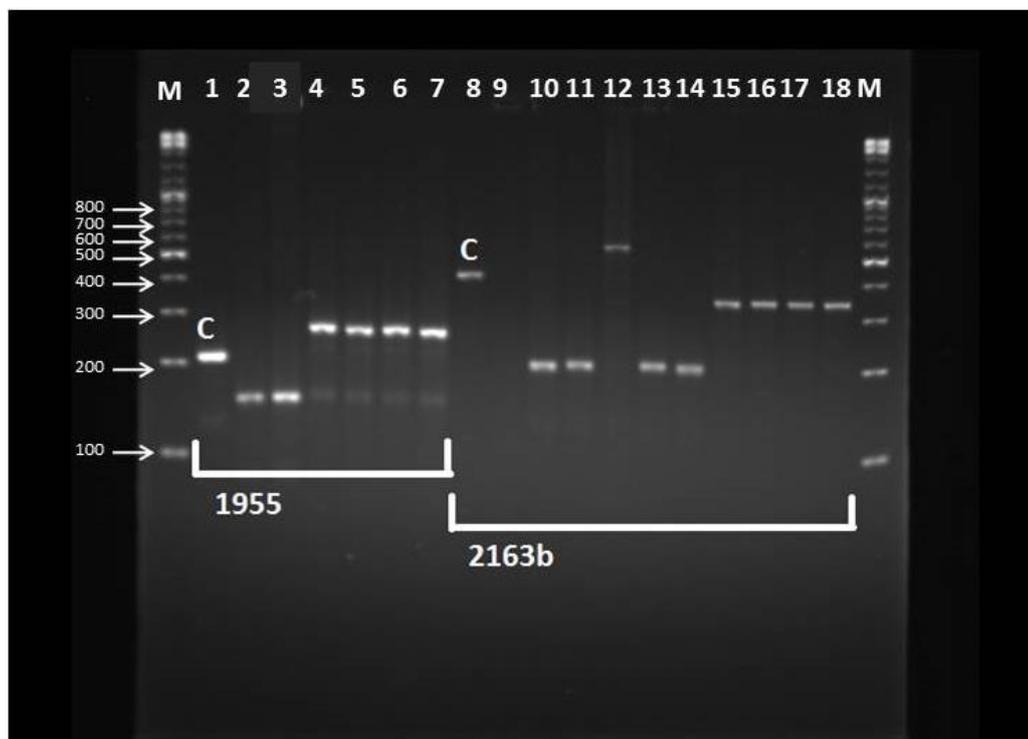


Figura 13: Imagen gel electroforesis agarosa de locus 1955 y 2163b. **M:** Marcador de peso molecular; **Carril 1:** Cepa control H37Ra (VNTR 1955) , PM: 203, 2 copias MIRU, **Carril 2:** Cepa 34-2010, PM: 149, 1 copia MIRU; **Carril 3:** Cepa 36-2010, PM: 149, 1 copia MIRU; **Carril 4:** Cepa 39-2010, PM: 256, 3 copia MIRU; **Carril 5:** Cepa 41-2010, PM: 256, 3 copias MIRU; **Carril 6:** Cepa 61-2010, PM: 256, 3 copias MIRU; **Carril 7:** Cepa 62-2010, PM: 256, 3 copias MIRU; **Carril 8:** Cepa H37Ra (QUB-11b), PM: 417, 5 copias MIRU; **Carril 9:** Cepa 5-2011, no se obtuvo resultado; **Carril 10:** Cepa 9-2011, PM: 204, 2 copias MIRU; **Carril 11:** Cepa 13-2011, PM: PM: 204, 2 copias MIRU; **Carril 12:** Cepa 16-2011, PM: 560, 7 copias MIRU; **Carril 13:** Cepa 21-2011, PM: 204, 2 copias MIRU; **Carril 14:** Cepa 24-2011, PM: 204, 2 copias MIRU; **Carril 15:** Cepa 41-2011, PM: 346, 4 copias MIRU; **Carril 16:** Cepa 48-2011, PM: 346, 4 copias MIRU; **Carril 17:** Cepa 50-2011, PM: 346, 4 copias MIRU; **Carril 18:** Cepa 51-2011, PM: 346, 4 copias MIRU.

Resultados

Los PM para los MIRUs 10, 16 y 31 de algunos aislados y su correspondencia con el número de repeticiones, obtenido a partir de electroforesis capilar, se muestran en las Figuras 14 a 17.

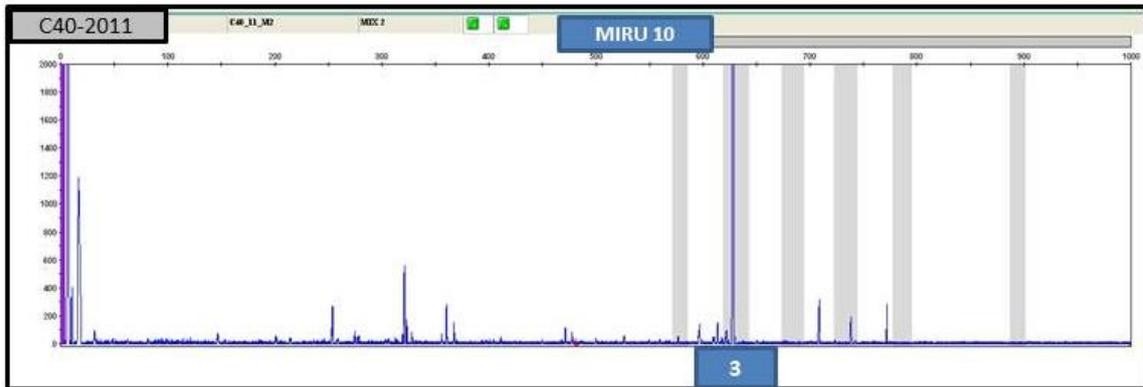


Figura 14: Imagen de electroforesis capilar de MIRU 10: Muestra C40-2010.

PM 638, 3 copias MIRU.

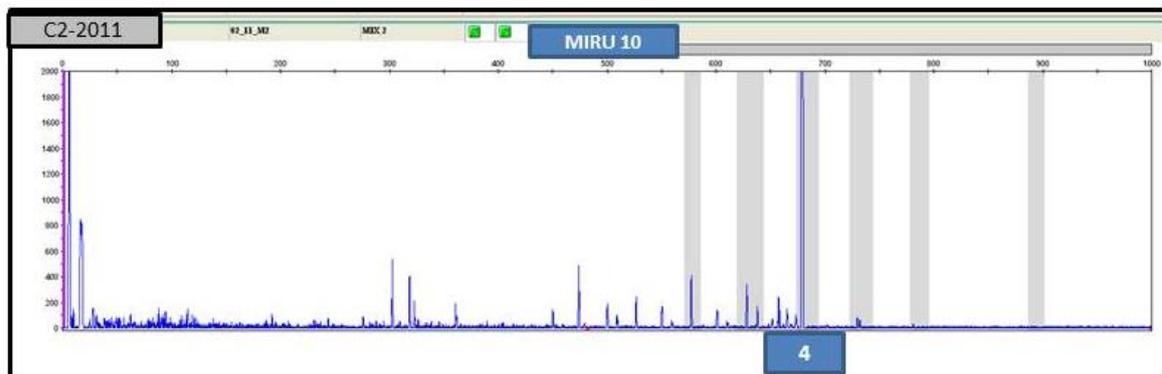


Figura 15: Imagen de electroforesis capilar de MIRU 10: Muestra C2-2011.

PM: 691, 4 copias MIRU.

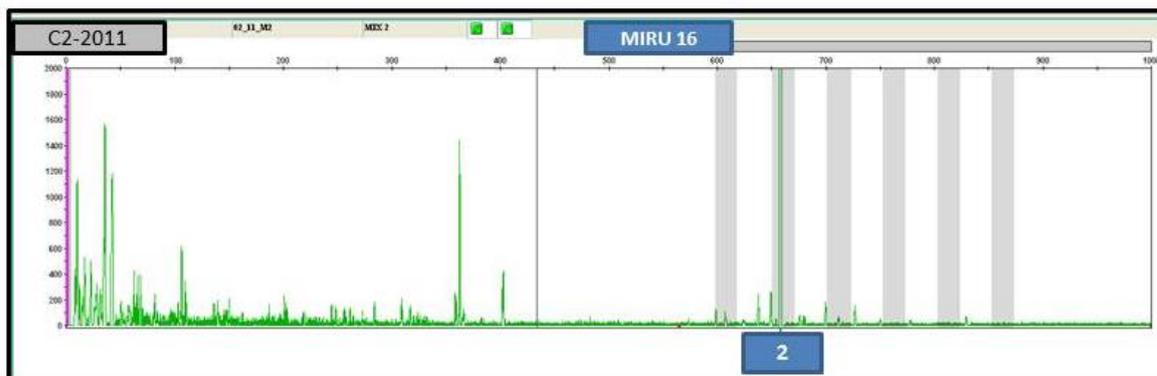


Figura 16: Imagen de electroforesis capilar de MIRU 16: Muestra C2-2011.

PM: 670, 2 copias MIRU.

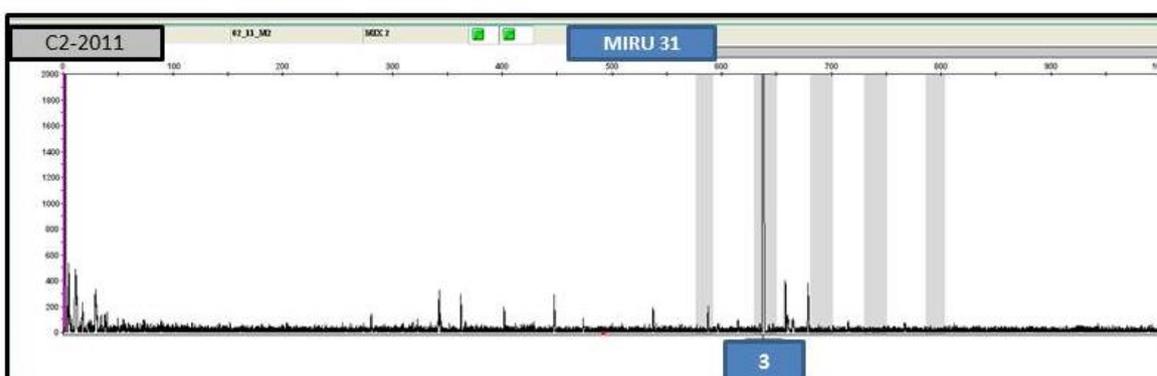


Figura 17: Imagen de electroforesis capilar de MIRU 31: Muestra C2-2011.

PM: 639, 3 copias MIRU.

Con el número de repeticiones que se obtuvo de cada MIRU-VNTR para cada muestra (patrón numérico), se creó una base de datos Excel (Microsoft®), especialmente diseñada, para introducir los resultados en el portal MIRU-VNTR *plus* que se muestran en las Tablas de la 19 a la 21. En estas Tablas se muestra, en negro, los resultados obtenidos por electroforesis capilar y, en rojo, los que se consiguieron a partir de electroforesis en gel de agarosa. Esta serie de repeticiones permitieron asignar a cada una de las cepas del estudio un código MIRUs de 15 dígitos.

Resultados

IDENTIFICACIÓN CEPAS	MIRU 04	MIRU 26	MIRU 40	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 31	VNTR 42	VNTR 577	VNTR 2165
	580	2996	802	960	1644	3192	424	577	2165
C3-155080-2010	2	4	3	5	3	3	2	2	3
C4-154541-2010	2	5	4	3	3	3	2	4	3
C5-154616-2010	2	5	4	5	3	2	2	3	3
C6-154971-2010	2	3	3	4	3	3	3	4	2
C7-157089-2010	2	5	3	5	3	3	2	3	3
C8-163577-2010	2	5	4	5	3	3	2	3	3
C9-164004-2010	2	5	3	5	3	3	1	3	3
C10-167663-2010	2	3	4	4	3	3	4	3	2
C11-168163-2010	2	4	4	3	3	3	2	3	4
C12-170880-2010	2	5	4	3	3	3	2	4	2
C13-170392-2010	2	6	5	3	1	3	1	4	3
C14-167881-2010	2	5	7	4	3	3	3	4	2
C15-171677-2010	2	6	5	3	1	3	1	4	3
C16-170860-2010	2	5	4	3	3	3	2	4	3
C17-171672-2010	2	2	4	4	2	3	5	2	2
C18-172292-2010	2	3	3	4	3	3	2	4	2
C19-167521-2010	2	5	3	5	3	3	2	3	3
C20-163589-2010	2	3	4	3	3	3	3	4	2
C21-171912-2010	2	5	6	3	3	3	2	4	3
C22-172965-2010	2	4	4	2	1	3	2	4	3
C23-175434-2010	2	5	2	5	3	3	2	3	3
C24-174481-2010	3	5	5	2	3	3	2	4	3
C26-171655-2010	2	6	3	5	3	3	2	3	3
C27-174864-2010	2	4	3	5	3	3	2	3	3
C28-177888-2010	2	5	3	5	3	4	2	4	3
C29-177889-2010	2	5	1	3	4	3	2	4	3
C33-181457-2010	2	6	5	3	1	3	1	4	3
C34-180615-2010	2	4	3	5	3	3	2	3	3
C35-180631-2010	2	5	1	5	3	3	2	3	3
C36-180314-2010	2	4	3	5	3	3	2	3	3
C37-182545-2010	2	6	3	4	3	4	2	4	3
C39-182120-2010	2	5	3	5	3	2	2	3	3
C40-183460-2010	3	3	2	6	2	4	2	5	2
C41-185539-2010	2	5	3	5	3	3	2	3	3
C42-183133-2010	2	5	3	4	3	2	3	4	2
C43-188832-2010	2	3	4	4	3	3	2	4	2
C44-188349-2010	2	5	2	3	3	3	2	4	3
C45-184380-2010	2	5	3	2	3	2	2	2	3
C46-190007-2010	2	5	4	3	3	3	2	4	2
C47-190818-2010	2	6	3	5	3	2	2	3	3
C48-191485-2010	2	4	4	3	1	4	1	4	3
C49-191798-2010	2	8	4	4	3	4	2	4	1
C50-192213-2010	2	4	4	3	3	3	2	3	4
C51-192820-2010	2	4	4	3	1	3	2	5	3
C52-193443-2010	2	5	4	3	3	3	2	4	3
C53-196311-2010	2	5	1	5	2	4	2	3	2
C54-199694-2010	2	5	3	4	2	3	3	2	2
C55-197970-2010	2	5	3	5	3	3	2	3	3
C56-199931-2010	2	6	3	5	3	3	2	3	3
C57-193982-2010	2	5	3	5	4	3	2	3	3
C58-199630-2010	2	5	3	4	3	4	2	3	3
C59-202593-2010	2	5	3	5	2	3	2	3	2
C60-203732-2010	2	3	3	4	3	3	2	4	2
C61-205465-2010	2	5	3	5	2	3	2	3	2
C62-205255-2010	2	5	5	4	2	3	3	4	2
C63-203928-2010	2	1	2	5	1	3	1	2	3
C64-209181-2010	3	4	2	3	3	2	1	4	4
C65-209182-2010	2	5	3	2	3	3	1	4	4
C66-210457-2010	2	6	7	4	3	2	3	5	2
C67-209932-2010	2	1	1	3	2	3	2	3	2

Tabla 19: Distribución del número de repeticiones para los loci MIRU de cada cepa aislada en el 2010.

IDENTIFICACIÓN CEPAS	VNTR 2401	VNTR 3090	VNTR 4156	VNTR 2163b	VNTR 1955	VNTR4052
	2401	3690	4156	2163b	1955	4052
C3-155080-2010	3	5	3	2	1	6
C4-154541-2010	2	5	2	3	2	5
C5-154616-2010	4	4	3	4	3	7
C6-154971-2010	2	1	2	4	2	8
C7-157089-2010	4	3	3	3	3	4
C8-163577-2010	4	3	2	5	2	4
C9-164004-2010	4	3	1	7	3	5
C10-167663-2010	2	1	2	2	2	6
C11-168163-2010	2	3	2	3	3	2
C12-170880-2010	2	3	3	3	2	5
C13-170392-2010	2	5	2	2	2	5
C14-167881-2010	1	2	2	2	3	2
C15-171677-2010	2	5	2	2	2	5
C16-170860-2010	2	3	2	3	2	5
C17-171672-2010	2	1	2	4	2	7
C18-172292-2010	2	1	1	4	2	8
C19-167521-2010	4	2	3	5	3	3
C20-163589-2010	2	1	2	3	2	3
C21-171912-2010	2	2	2	3	2	5
C22-172965-2010	2	2	2	3	2	5
C23-175434-2010	4	3	2	4	2	6
C24-174481-2010	2	3	2	2	2	5
C26-171655-2010	4	3	2	5	2	6
C27-174864-2010	4	3	2	2	1	6
C28-177888-2010	4	7	3	4	3	8
C29-177889-2010	2	3	2	4	2	5
C33-181457-2010	2	5	2	2	2	5
C34-180615-2010	4	3	3	2	1	6
C35-180631-2010	4	3	3	5	3	7
C36-180314-2010	4	3	3	2	1	6
C37-182545-2010	4	7	3	4	3	7
C39-182120-2010	3	3	3	2	3	5
C40-183460-2010	4	6	3	4	3	4
C41-185539-2010	4	3	3	5	3	5
C42-183133-2010	2	1	2	3	3	1
C43-188832-2010	2	1	2	3	2	2
C44-188349-2010	1	3	2	4	2	7
C45-184380-2010	1	2	2	2	3	5
C46-190007-2010	2	3	2	3	2	5
C47-190818-2010	4	3	3	5	3	8
C48-191485-2010	2	1	2	3	2	4
C49-191798-2010	2	1	2	3	2	3
C50-192213-2010	2	3	2	3	3	2
C51-192820-2010	2	5	2	3	2	5
C52-193443-2010	2	3	2	3	2	5
C53-196311-2010	4	3	3	3	3	7
C54-199694-2010	2	1	2	4	3	7
C55-197970-2010	4	3	3	5	2	8
C56-199931-2010	4	2	1	5	2	1
C57-193982-2010	4	5	3	6	3	7
C58-199630-2010	4	3	3	3	2	8
C59-202593-2010	2	3	3	5	3	0
C60-203732-2010	2	1	2	4	2	8
C61-205465-2010	2	3	4	5	3	9
C62-205255-2010	1	2	3	2	3	3
C63-203928-2010	4	3	3	2	3	9
C64-209181-2010	2	3	2	5	1	9
C65-209182-2010	2	9	2	4	3	5
C66-210457-2010	1	2	2	2	2	6
C67-209932-2010	2	3	2	4	2	5

Tabla 19 (continuación): Distribución del número de repeticiones para los loci MIRU de cada cepa aislada en el 2010.

Resultados

IDENTIFICACIÓN CEPAS	MIRU 04	MIRU 26	MIRU 40	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 31	VNTR 42	VNTR 577	VNTR 2165
	580	2996	802	960	1644	3192	424	577	2165
C1-211722-2011	2	7	2	5	3	3	2	3	3
C2-213810-2011	2	1	1	4	2	3	4	2	2
C3-214939-2011	2	1	7	3	3	3	3	4	3
C4-214364-2011	2	4	2	3	4	3	2	4	2
C5-217175-2011	2	1	3	6	1	2	1	4	1
C6-218551-2011	2	1	5	3	1	3	1	4	3
C7-218308-2011	2	5	4	3	3	3	2	4	2
C8-219409-2011	2	6	3	5	4	4	5	2	4
C9-221752-2011	2	4	3	5	3	3	2	3	3
C10-221332-2011	2	4	5	3	1	3	2	2	2
C11-222192-2011	2	4	4	3	3	3	2	4	3
C12-244659-2011	2	6	5	3	1	3	1	4	3
C13-224769-2011	2	5	6	4	3	3	2	3	2
C14-225818-2011	2	6	5	3	1	3	1	4	3
C15-227007-2011	2	5	3	5	2	4	2	3	3
C16-227007-2011	2	2	3	6	3	5	2	2	6
C18-229242-2011	2	5	5	4	2	3	3	4	2
C19-231919-2011	2	5	4	3	3	3	2	4	2
C20-233440-2011	2	5	3	5	3	3	0	3	3
C21-234815-2011	2	5	4	3	3	3	2	4	3
C22-240905-2011	2	5	3	5	3	3	2	3	3
C23-240477-2011	2	4	1	3	2	3	4	4	2
C24-243623-2011	2	9	2	4	3	4	2	4	2
C25-244440-2011	2	5	3	5	3	3	2	2	3
C26-246359-2011	2	5	6	4	3	3	3	3	2
C27-243867-2011	3	5	2	5	4	5	3	6	4
C28-242330-2011	2	4	5	3	1	3	2	2	3
C29-246850-2011	2	5	3	1	3	3	2	2	2
C30-246695-2011	2	4	3	4	2	3	2	3	3
C31-250868-2011	2	1	3	3	2	3	2	4	1
C32-250484-2011	2	5	6	4	3	3	3	3	2
C33-252436-2011	2	4	4	3	1	3	4	5	3
C34-253188-2011	2	5	3	5	3	3	2	3	3
C35-253171-2011	2	4	1	2	3	2	2	3	3
C36-253653-2011	2	1	3	5	3	2	2	3	3
C37-253775-2011	2	4	3	4	2	3	4	2	2
C38-252988-2011	2	1	3	5	3	3	2	3	3
C39-254805-2011	2	5	4	4	2	3	3	2	2
C40-255840-2011	2	4	3	3	3	5	4	2	4
C41-259712-2011	2	5	3	4	2	3	5	2	2
C42-259329-2011	2	4	5	3	1	3	2	2	3
C43-255748-2011	2	1	3	5	3	3	2	2	3
C44-261079-2011	2	5	4	3	3	3	2	4	2
C45-259325-2011	2	4	3	4	3	3	4	4	2
C47-261551-2011	2	5	4	3	3	3	2	4	3
C48-260659-2011	2	4	5	3	1	3	2	4	2
C49-262346-2011	2	4	3	4	3	3	2	4	2
C50-261539-2011	2	6	5	3	3	3	3	4	3
C51-259875-2011	2	4	3	4	2	3	4	2	2
C52-264244-2011	2	5	1	6	2	3	4	4	2
C54-268731-2011	2	5	0	3	1	3	2	4	3
C55-269686-2011	2	5	2	5	3	2	4	1	3
C56-268309-2011	2	5	4	3	3	3	2	4	3
C57-268842-2011	2	5	3	6	3	3	2	3	3
C58-274258-2011	2	5	3	5	2	3	2	3	2
C60-274676-2011	2	4	3	5	3	3	2	3	3

Tabla 20: Distribución del número de repeticiones para los loci MIRU de cada cepa aislada en el 2011.

IDENTIFICACIÓN CEPAS	VNTR 2401	VNTR 3090	VNTR 4156	VNTR 2163b	VNTR 1955	VNTR4052
	2401	3690	4156	2163b	1955	4052
C1-211722-2011	4	3	2	5	2	7
C2-213810-2011	1	2	2	3	3	1
C3-214939-2011	2	2	2	3	2	5
C4-214364-2011	2	2	2	5	2	2
C5-217175-2011	4	3	2		3	4
C6-218551-2011	2	5	2	2	2	5
C7-218308-2011	2	3	2	3	2	5
C8-219409-2011	2	3		2	4	4
C9-221752-2011	4	3	3	2	1	6
C10-221332-2011	2	3	2	4	2	5
C11-222192-2011	2	3	2	3	2	3
C12-244659-2011	2	5	3	1	2	5
C13-224769-2011	2	2	3	2	1	8
C14-225818-2011	2	2	3	2	2	5
C15-227007-2011	4	3	2	2	3	5
C16-227007-2011	2	5	2	7	7	3
C18-229242-2011	1	2	3	2	3	3
C19-231919-2011	2	3	2	3	2	5
C20-233440-2011	4	3	3	4	3	6
C21-234815-2011	2	2	2	2	2	5
C22-240905-2011	3	3	3	5	3	5
C23-240477-2011	2	2	2	4	3	9
C24-243623-2011	2	5	2	2	2	5
C25-244440-2011	4	3	2	3	3	4
C26-246359-2011	1	2	3	2	1	8
C27-243867-2011	4	1	2	3	1	2
C28-242330-2011	2	3	2	3	2	5
C29-246850-2011	4	4	2	5	3	5
C30-246695-2011	4	3	3	5	4	9
C31-250868-2011	2	3	2	2	2	5
C32-250484-2011	1	2	3	2	1	8
C33-252436-2011	2	5	3	2	2	5
C34-253188-2011	4	3	4	3	3	1
C35-253171-2011	4	2	3	2	3	1
C36-253653-2011	3	3	3	2	3	1
C37-253775-2011	2	1	2	4	3	7
C38-252988-2011	4	3	3	2	2	6
C39-254805-2011	2	2	3	2	3	6
C40-255840-2011	4	3	2	6	5	2
C41-259712-2011	2	1	2	4	3	4
C42-259329-2011	2	3	2	3	2	5
C43-255748-2011	4	3	3	3	3	1
C44-261079-2011	1	2	3	3	5	10
C45-259325-2011	2	1	2	2	3	4
C47-261551-2011	2	5	2	3	2	5
C48-260659-2011	2	3	2	4	2	4
C49-262346-2011	2	1	2	3	3	4
C50-261539-2011	2	3	2	4	2	7
C51-259875-2011	2	1	2	4	3	7
C52-264244-2011	1	2	2	3	3	7
C54-268731-2011	2	2	2	3	2	6
C55-269686-2011	4	3	3	6	4	5
C56-268309-2011	2	3	2	3	2	5
C57-268842-2011	2	3	3	6	3	6
C58-274258-2011	4	5	3	5	3	6
C60-274676-2011	4	5	3	2	1	6

Tabla 20 (continuación): Distribución del número de repeticiones para los loci MIRU de cada cepa aislada en el 2011.

Resultados

IDENTIFICACIÓN CEPAS	MIRU 04	MIRU 26	MIRU 40	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 31	VNTR 42	VNTR 577	VNTR 2165
	580	2996	802	960	1644	3192	424	577	2165
C4-284220-2012	2	5	3	5	3	3	2	3	3
C5-289186-2012	2	5	3	3	2	3	2	2	2
C6-291832-2012	2	5	4	3	3	2	3	2	2
C7-291560-2012	2	5	6	3	3	3	2	4	3
C8-294839-2012	2	5	2	3	4	3	2	3	2
C9-294771-2012	2	4	4	3	2	2	4	2	2
C10-292327-2012	2	6	1	4	3	3	3	3	3
C11-292325-2012	2	5	4	3	3	2	2	2	2
C12-296741-2012	2	5	4	4	2	4	1	4	2
C13-299463-2012	2	5	3	5	3	3	2	3	3
C14-297729-2012	2	9	3	6	4	4	2	2	4
C16-306713-2012	2	5	3	4	3	2	4	3	3
C17-310181-2012	2	5	3	5	2	3	4	3	2
C18-314829-2012	2	1	2	6	2	3	4	4	3
C19-318852-2012	2	4	1	2	3	2	1	3	3
C20-320559-2012	2	6	5	3	1	3	1	4	3
C21-320486-2012	2	4	6	4	2	3	3	4	2
C22-318636-2012	2	5	3	5	2	3	2	3	3
C23-319313-2012	2	5	3	5	3	3	2	3	3
C24-322678-2012	2	5	3	6	3	3	2	3	3
C25-321886-2012	2	5	3	5	2	3	4	3	2
C26-319737-2012	2	5	4	3	3	3	2	4	3
C27-325495-2012	2	6	5	3	1	3	1	4	3
C28-326640-2012	2	5	3	4	3	3	2	3	2
C29-320703-2012	2	4	6	4	3	3	3	4	2
C30-306703-2012	2	4	5	3	1	3	2	5	2
C31-321885-2012	2	5	3	5	3	3	2	3	3
C32-330564-2012	2	1	3	4	2	3	3	2	1
C33-329425-2012	2	5	1	3	3	3	2	4	3
C34-327048-2012	2	5	2	3	4	3	3	4	2
C36-326641-2012	2	5	2	3	4	2	2	4	2
C37-335696-2012	2	5	4	4	2	3	3	4	2
C38-336593-2012	2	6	3	5	3	2	3	2	3
C39-338280-2012	2	5	3	5	3	3	2	3	3
C40-338726-2012	2	5	3	5	3	3	2	3	3

Tabla 21: Distribución del número de repeticiones para los loci MIRU de cada cepa aislada en el 2012.

IDENTIFICACIÓN CEPAS	VNTR 2401	VNTR 3090	VNTR 4156	VNTR 2163b	VNTR 1955	VNTR4052
	2401	3690	4156	2163b	1955	4052
C4-284220-2012	4	3	3	8	3	7
C5-289186-2012	2	1	2	3	3	7
C6-291832-2012	1	2	2	2	3	6
C7-291560-2012	2	2	2	3	2	5
C8-294839-2012	2	3	2	3	2	5
C9-294771-2012	1	2	2	2	1	6
C10-292327-2012	1	2	1	2	3	6
C11-292325-2012	1	2	2	2	3	6
C12-296741-2012	1	2	3	2	3	6
C13-299463-2012	4	3	3	5	3	4
C14-297729-2012	4	4	4	2	3	4
C16-306713-2012	4	3	3	3	2	8
C17-310181-2012	4	4	3	4	2	7
C18-314829-2012	3	3	3	1	3	1
C19-318852-2012	4	2	3	2	3	6
C20-320559-2012	2	5	2	3	4	5
C21-320486-2012	1	2	3	2	3	5
C22-318636-2012	4	3	3	3	2	6
C23-319313-2012	4	3	3	3	3	6
C24-322678-2012	4	3	3	2	1	6
C25-321886-2012	4	4	3	3	4	4
C26-319737-2012	2	3	2	3	2	5
C27-325495-2012	2	5	2	2	1	5
C28-326640-2012	4	4	3	4	3	1
C29-320703-2012	1	2	3	2	3	1
C30-306703-2012	2	2	2	3	2	6
C31-321885-2012	4	3	3	5	3	4
C32-330564-2012	2	1	3	5	3	1
C33-329425-2012	2	3	2	3	2	5
C34-327048-2012	2	2	2	4	2	6
C36-326641-2012	2	3	2	3	2	6
C37-335696-2012	1	2	4	1	3	9
C38-336593-2012	4	3	3	3	3	8
C39-338280-2012	4	3	2	4	3	1
C40-338726-2012	4	1	2	4	3	5

Tabla 21 (continuación): Distribución del número de repeticiones para los loci MIRU de cada cepa aislada en el 2012.

Una vez se introdujeron todos los códigos en el portal de internet MIRU-VNTR *plus*, se determinó la relación genética de los 151 aislados genotipados con un árbol de mínima expansión, el cual evidenció que 122 cepas presentaban un patrón único. Además determinó la presencia de 12 *clusters*, que incluían 29 cepas (Figura 18), considerando *cluster* o brote a la agrupación de 2 o más cepas idénticas para los 15 loci estudiados.

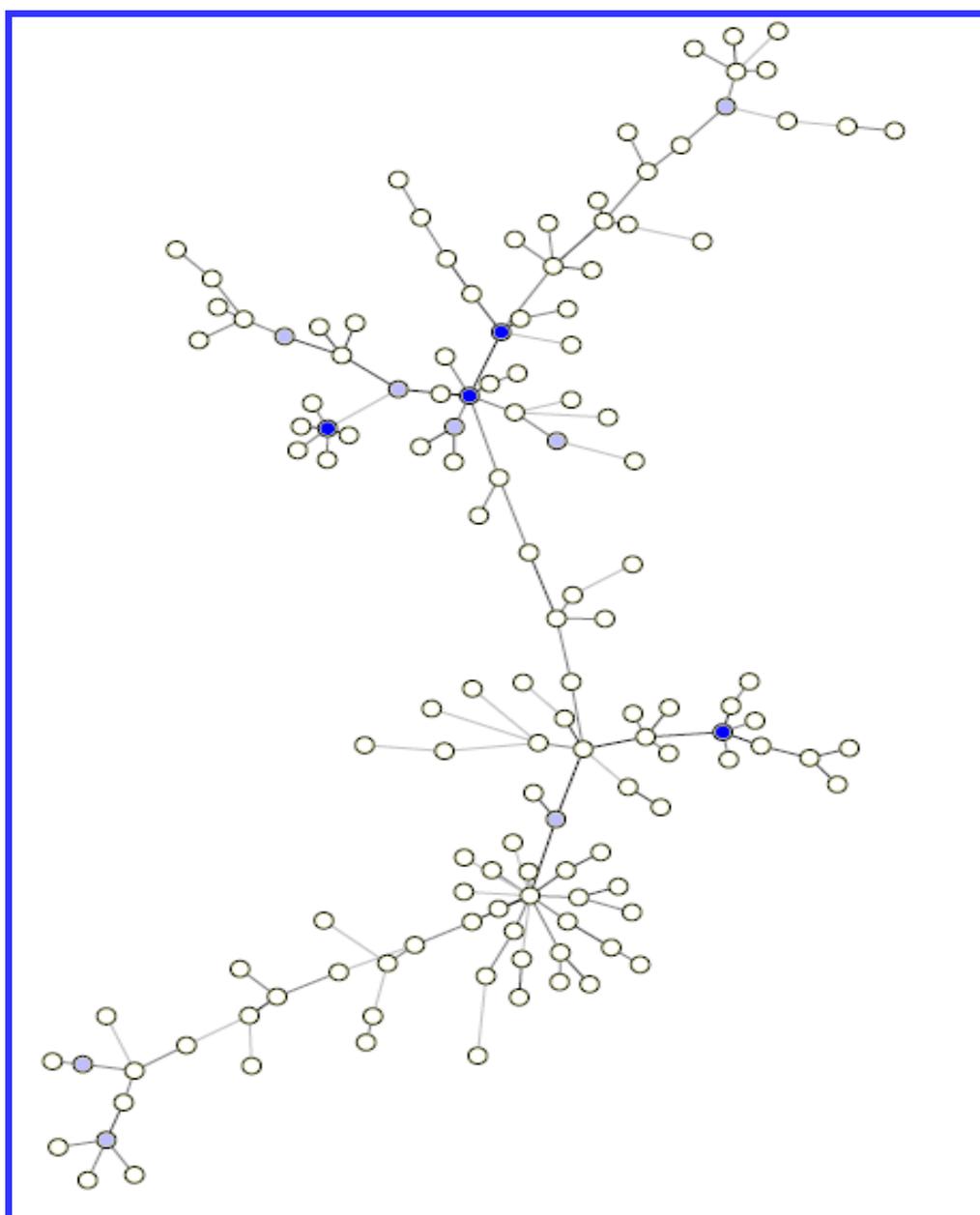


Figura 18: Árbol de mínima expansión que formaron las 151 cepas del estudio. Los círculos blancos representan las cepas con patrón único y los círculos con color las cepas en *cluster*, señalando en color azul claro los *clusters* formados por 2 miembros y en azul más intenso agrupaciones formadas por 3 o más miembros.

El árbol de mínima expansión muestra la relación que hay entre los diferentes genotipos de las 151 cepas: los círculos blancos representan los patrones huérfanos y los círculos azules los casos en *cluster*, siendo más intenso el color cuantos más miembros forman la agrupación. El número de aislados de cada brote varió entre 2 y 4 miembros. El porcentaje de agregación fue de 19,2% (29/151) y la tasa de transmisión de 11,3%.

Con todo ello podemos afirmar que en nuestro entorno, durante los años 2010 al 2012 y con la limitación de que no se pudo recuperar todas las cepas estudiadas, el 80,8% (122/155) de los casos con cultivo positivo se debía a reactivaciones de infecciones antiguas y el 19,2% (29/151) eran casos de transmisión reciente.

De los 7 brotes que se habían sospechado por ECC, sólo se confirmaron 5 por epidemiología molecular, al no poder recuperar en los otros dos brotes una de las dos cepas de los pacientes que formaban el *cluster*. Pero, gracias a la aplicación de la técnica 15 MIRU-VNTR, se constató que durante esos 3 años, además de confirmar las agrupaciones anteriores, se detectaron 7 brotes más.

Pudimos conocer que los casos españoles se agrupaban más que los extranjeros, 21,2% (18/85) vs 16,7% (11/66). Del total de agrupaciones, 6 (50%) incluyeron únicamente pacientes españoles; 3 (25%) estaban formadas sólo por extranjeros; y 3 (25%) fueron mixtas. De los 11 extranjeros, un 45,5% se encontraba en agrupaciones mixtas y un 54,5% en agrupaciones formadas únicamente por extranjeros.

El 27,3% de los extranjeros que se agruparon procedían de Marruecos, el 27,3% de Rumanía; el 18,2% de Perú; y los 3 restantes (27,3%) de Alemania, Ucrania e Italia.

De los pacientes en *cluster*, el 58,6% eran hombres y el 41,4% mujeres. En cuanto a la edad, 3 (10,3%) eran menores de 15 años (2 de ellos con 6 meses y 1 año respectivamente); 22 (75,9%) tenían entre 15 y 59 años; y 4 (13,8%) pacientes eran mayores de 65 años.

En el 93,1% de los casos la forma clínica fue pulmonar, mientras que en 2 casos (6,9%) fue extrapulmonar, una ganglionar y otra pleural.

Además, indicar que las baciloscopias habían sido positivas en 21 (72,4%) de las muestras y de las 8 (27,6%) negativas, 2 pertenecían a los casos de 6 meses y 1 año;

1 al paciente de la TB pleural; y otras 5 eran de casos con TB pulmonar (en uno de ellos la muestra había sido un lavado broncoalveolar).

Analizando si los pacientes agrupados eran población de riesgo, se pudo constatar que 7 (24,1%) de ellos si tenían esta característica. Uno procedía de un centro penitenciario; 3 padecían diabetes; 2 neoplasia; y, por último, un caso presentaba a la vez alcoholismo y neoplasia. No hubo ningún caso de coinfección con el VIH.

De las 29 cepas, 8 (27,6%) mostraron resistencia a uno o a más fármacos de primera línea; 5 lo fueron a H y a S; 2 a S; y una presentó resistencia a S y a P. Esta última compartió patrón con una cepa totalmente sensible. Ninguno de los casos agrupados presentó MR.

El primer *cluster* lo formaron 3 cepas sensibles a los cinco fármacos de primera línea, pertenecientes a 3 casos de nacionalidad española: una mujer de 82 años con TB ganglionar; y 2 hombres, de 40 y 34 años con TB pulmonar. Ninguno presentaba factores de riesgo. Los 3 casos tenían la baciloscopia positiva.

El segundo *cluster* fue una agrupación mixta formada por 4 cepas de 4 pacientes, sensibles a los 5 fármacos de primera línea: una paciente alemana de 59 años, una rumana de 29; y 2 españoles con 69 y 46 años. Todos ellos padecían TB pulmonar y no tenían factores de riesgo. Tres casos tuvieron la baciloscopia positiva y uno negativa.

El tercer *cluster* estuvo compuesto por 2 cepas resistentes a H y a S que pertenecían a 2 casos de nacionalidad peruana: una mujer de 15 años y un hombre de 16 con TB pulmonar. No presentaron factores de riesgo y los 2 casos eran bacilíferos.

El cuarto *cluster* lo formaban 2 cepas, sensibles a los 5 fármacos, de 2 pacientes de nacionalidad española: un hombre de 20 años y una mujer de 15, con TB pulmonar. Tampoco tenían factores de riesgo y los 2 casos tenían la baciloscopia positiva.

El quinto *cluster* estuvo constituido también por 2 cepas sensibles, propias de 2 pacientes de nacionalidad española: 2 hombres de 42 y 54 años con TB pulmonar. Uno de ellos era población de riesgo, puesto que procedía de un centro penitenciario, y el otro refería simultáneamente neoplasia y alcoholismo. Ambos con baciloscopia positiva.

El sexto *cluster* fue una agregación mixta formada por 3 cepas sensibles de 3 pacientes: una mujer de 29 años de nacionalidad rumana; una niña de 6 meses de nacionalidad española; y un hombre de 46 años también autóctono. Los tres casos

fueron TB pulmonar y sin factores de riesgo. Los dos adultos fueron casos bacilíferos, mientras que la niña tuvo la baciloscopia negativa.

El séptimo *cluster* estuvo formado por 2 cepas pertenecientes a 2 casos extranjeros: una paciente de 13 años de nacionalidad marroquí, con TB pleural; y que presentó resistencia a P y a S; y el otro caso era un rumano de 43 años con TB pulmonar. En ambos casos sin factores de riesgo. El caso con TB pleural tuvo baciloscopia negativa, mientras que la del caso con TB pulmonar fue positiva.

El octavo *cluster* constaba de 3 cepas resistentes a H y a S pertenecientes a: una paciente de nacionalidad italiana de 50 años; un paciente ucraniano de 1 año; y una española de 44 años. Los tres casos carecían de factores de riesgo, presentaban TB pulmonar, dos con baciloscopia positiva y el niño la tuvo negativa.

Por lo que se refiere al noveno *cluster*, cabe señalar que agrupaba a 2 cepas resistentes a S pertenecientes a 2 pacientes de nacionalidad española, con TB pulmonar: una mujer de 32 años sin factores de riesgo y con baciloscopia positiva; y un hombre de 66 años, diabético y con baciloscopia negativa.

El décimo *cluster* lo constituyeron 2 cepas sensibles a los 5 fármacos pertenecientes a 2 pacientes españoles, con TB pulmonar: 2 hombres, uno de 40 años con diabetes, y el otro de 32 años con neoplasia, ambos con baciloscopia positiva.

El undécimo *cluster* estuvo formado por 2 cepas sensibles pertenecientes en ambos casos a marroquíes con TB pulmonar: 2 hombres de 43 y 53 años, sin factores de riesgo de padecer TB y ambos con baciloscopia negativa, uno de ellos considerado probable caso índice.

Por último, el duodécimo *cluster* lo integraron 2 cepas sensibles a los 5 fármacos pertenecientes a 2 pacientes de nacionalidad española y con TB pulmonar: una mujer de 46 años, con diabetes y baciloscopia positiva; y un hombre de 78 años, con neoplasia y que no era bacilífero.

En las Figuras 19 a 24 se muestran detalladamente todas las agrupaciones procedentes del árbol de mínima expansión, donde se puede ver el número de cepa y el año de aislamiento. Además, en el pie de Figura se indica la sensibilidad de las cepas y la nacionalidad, el sexo y edad de cada paciente.

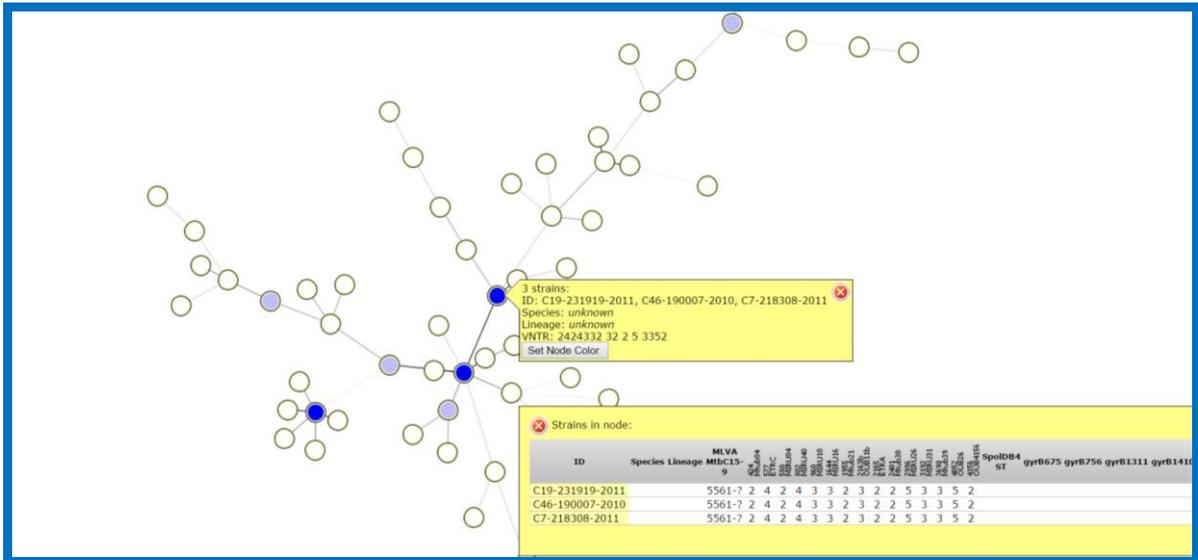


Figura 19: Representación del 1^{er} cluster formado por 3 cepas sensibles a todos los fármacos pertenecientes a 3 pacientes de nacionalidad española; 1 mujer y 2 hombres; y edades de 82, 40 y 34 años.

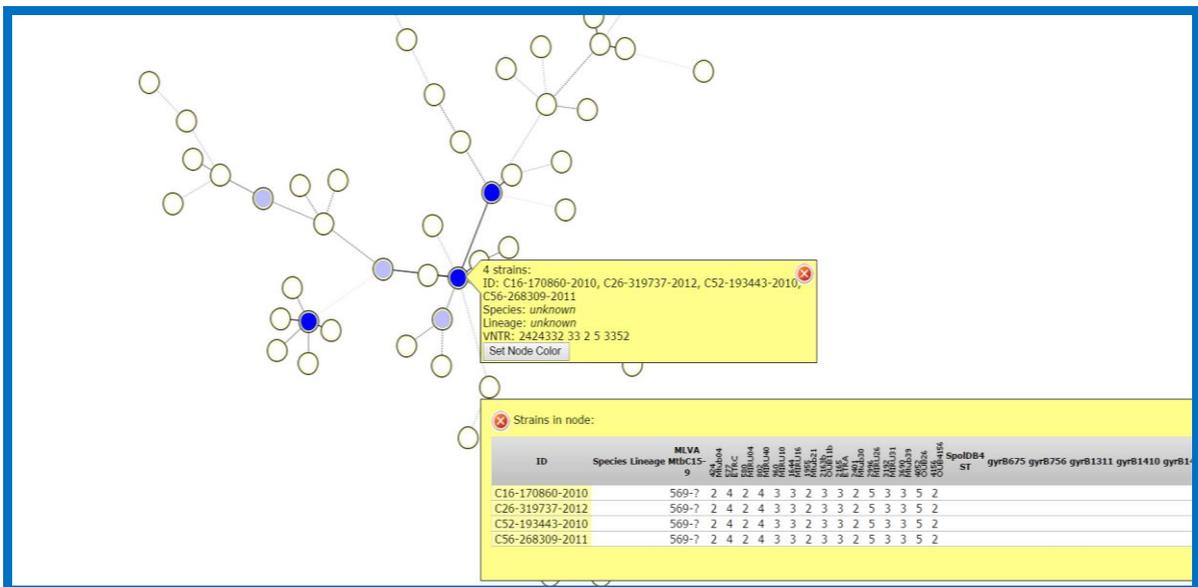


Figura 20: Representación del 2^o cluster formado por 4 cepas sensibles a todos los fármacos pertenecientes a 4 pacientes, 1 con nacionalidad alemana, 1 rumana y 2 española; 2 mujeres y 2 hombres; y edades de 59, 29, 69 y 46 años.

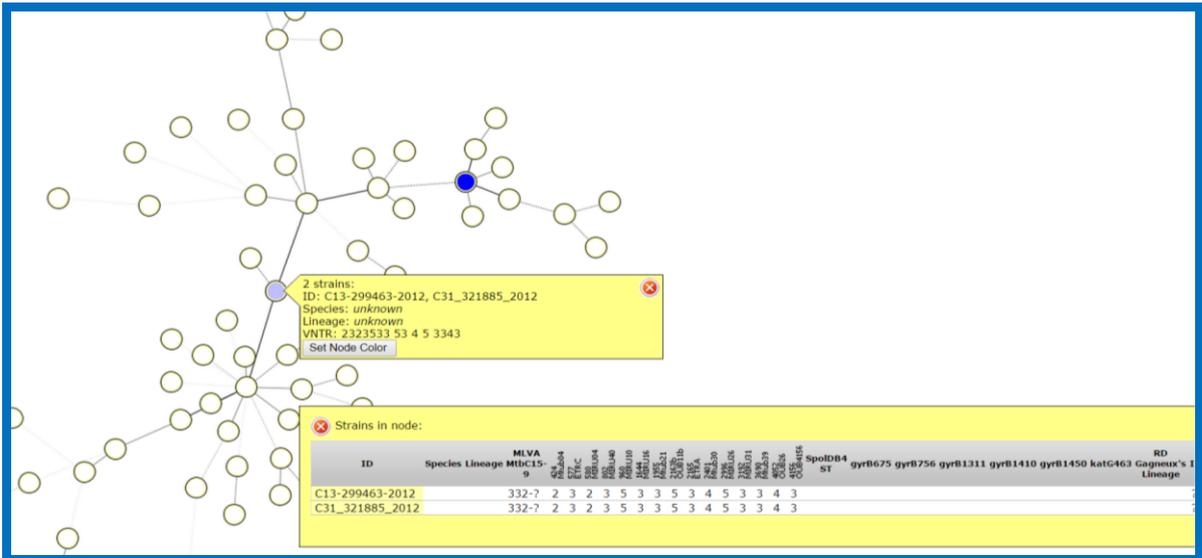


Figura 27: Representación del 9º *cluster* formado por 2 cepas resistentes a S, pertenecientes a 2 pacientes de nacionalidad española; 1 mujer y 1 hombre; y edades de 32 y 66 años.

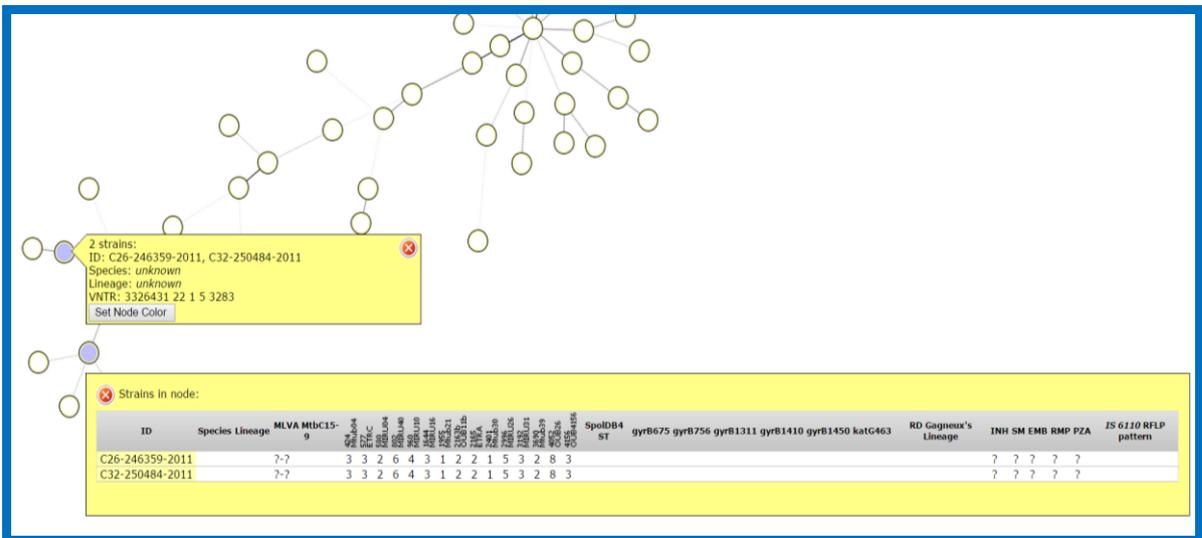


Figura 28: Representación del 10º *cluster* formado por 2 cepas sensibles a los 5 fármacos, pertenecientes a 2 pacientes de nacionalidad española; 2 hombres; y edades de 40 y 32 años.

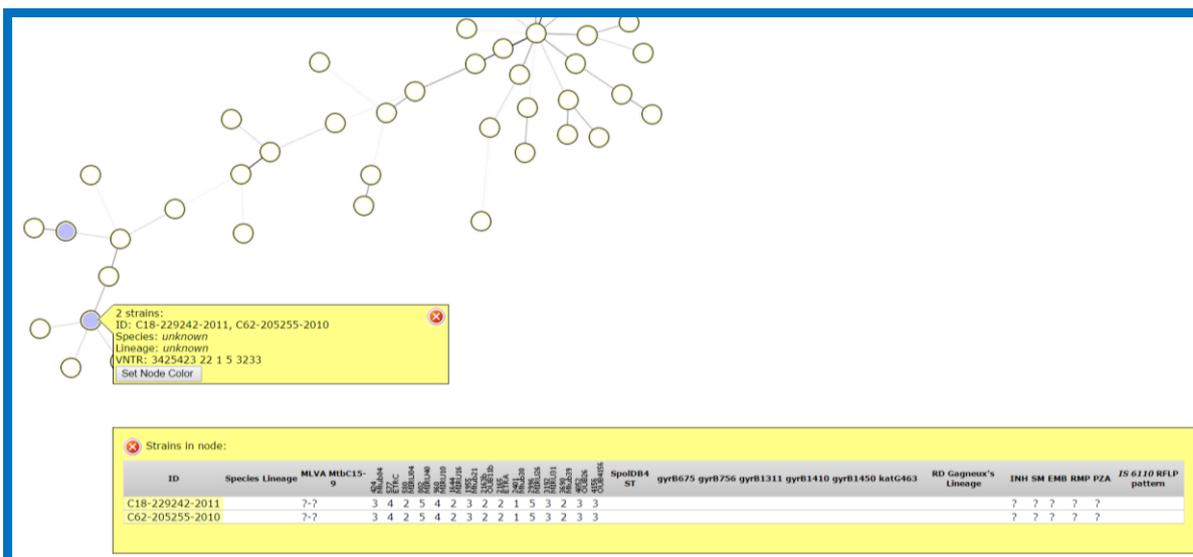


Figura 29: Representación del 11º cluster formado por 2 cepas sensibles a los 5 fármacos, pertenecientes a 2 pacientes de nacionalidad marroquí; 2 hombres; y edades de 43 y 53 años.

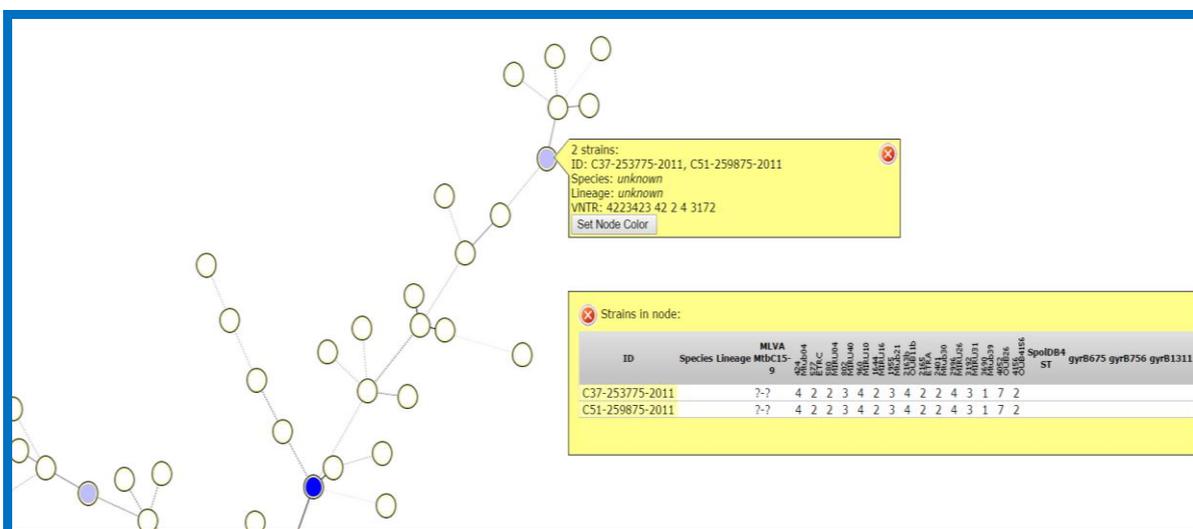


Figura 30: Representación del 12º cluster formado por 2 cepas sensibles a los 5 fármacos, pertenecientes a 2 pacientes de nacionalidad española; 1 mujer y un hombre; y edades de 46 y 78 años respectivamente.

En las 151 cepas estudiadas, se identificaron 122 (80,8%) patrones huérfanos que correspondían a 77 (63,1%) pacientes varones y 45 (36,9%) mujeres. Únicamente 2 (1,6%) casos en menores a 15 años presentaron patrón único, mientras que los mayores de 65 años lo hicieron en un 11,5% (14/122). Al analizar la nacionalidad, se observó que un 54,9% (67/122) eran españoles; un 27,9% (34/122) eran rumanos; un 7,4% (9/122) marroquíes; un 4,9% procedía de Centro y Sudamérica; y, por último, también un 4,9% procedían otros países. El 28,7% (35/122) presentaba algún factor de riesgo.

Por lo que se refiere a las formas clínicas, el 85,4% (104/122) padecían TB pulmonar; 7,4 % (9/122) TB ganglionar; 4,9% (6/122) TB pleural; y el resto, un 2,5% (3/122), fueron pacientes uno con una TB urinaria, otra peritoneal y otra endometrial. Además, cabe señalar que las baciloscopias fueron positivas en un 57,4% (70/122) de los casos y un 13,1% (16/122) de las cepas presentaron resistencias a uno o más fármacos de primera línea. Un 3,2% (4/122) lo fueron a H y a S; un 3,2% (4/122) a H; un 1,6% (2/122) a S; un 1,6% (2/122) a P; y 1 cepa (0,8%) fue resistente a S y a P. Cabe destacar que en este grupo un 2,5% (3/122) eran TB MR.

Cuando comparamos las características de los pacientes que estaban agrupados con los que presentaron patrones huérfanos, observamos que el porcentaje de mujeres en el primer grupo era algo superior (41,4% vs 36,9%). Sin embargo, la proporción de extranjeros es mayor en el grupo de patrones únicos. En el grupo de pacientes en *cluster*, los marroquíes y rumanos mostraron la misma proporción (27,3%), mientras que en el de patrones únicos fue muy superior la de los rumanos con un 27,3% vs un 7,4% de los marroquíes. Hubo un porcentaje más elevado de casos menores de 15 años dentro del grupo en *cluster* (10,3%), mientras que en el otro la proporción fue de un 1,6%. Sin embargo, la relación fue muy similar en los pacientes mayores de 65 años (13,8% vs 11,5%). Los casos con patrones únicos presentaron con más frecuencia factores de riesgo de padecer TB (28,7% vs 20,7%). Una mayor proporción de casos con TB extrapulmonar (14,6% vs 6,9%) mostraron patrones huérfanos y el porcentaje de casos con baciloscopia positiva fue mayor en las agrupaciones (72,4% vs 57,4%). Respecto a las cepas resistentes, la proporción fue mayor en los pacientes en *cluster* (27,6% vs 13,1%).

5.- DISCUSIÓN

Este trabajo es el primero realizado en la provincia de Castellón que reúne los principales aspectos de la TB. Describe las características clínico-epidemiológicas y microbiológicas de los casos diagnosticados con cultivo positivo, detalla la frecuencia de resistencias de *M. tuberculosis* frente a los fármacos de primera línea, y analiza los patrones de transmisión de la TB mediante tipificación molecular, utilizando la técnica 15 MIRU-VNTR por primera vez en nuestra provincia.

Este capítulo está dedicado a discutir los resultados obtenidos en la presente Tesis. Para ello, y con la finalidad de aportar claridad a la discusión, hemos considerado oportuno en primer lugar, comparar nuestros resultados con los obtenidos en trabajos previos realizados en nuestra provincia; y posteriormente, con los de otros estudios similares llevados a cabo por autores a nivel nacional y en otros escenarios geográficos de Europa y de otros países fuera de Europa. Nuestra intención es detallar, de una forma clara y precisa, cómo ha evolucionado la TB en Castellón y situarnos dentro del panorama que esta enfermedad supone como problema de Salud Pública.

5.1.- Sobre la evolución epidemiológica y clínica de la tuberculosis

En la provincia de Castellón se produjo una tendencia decreciente en la tasa de incidencia de TB, que pasó de 18 por 10^5 habitantes en el año 2008 a 9,6 por 10^5 en el año 2012 (Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat, 2009, 2013). Con respecto a las tasas notificadas para la provincia en la década de los 90, que era del orden de 27 por 10^5 habitantes, supone una reducción de casi una tercera parte (Moreno *et al.*, 1996).

En España, la tasa de 18,4 por 10^5 habitantes en el año 2008 (Rodríguez *et al.*, 2009) pasó a ser de 13 casos por 10^5 en el 2012 (CNE, 2013).

El ECDC, en el año 2008, describe una tasa media de 16,7 casos por 10^5 habitantes (ECDC, 2010) y en su último informe *Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2014* (ECDC, 2014), notificó una tasa media de incidencia para la UE de 13,5 por 10^5 en 2012, con un rango que iba de 3,4 casos por 10^5 de Islandia, a los 85,2 por 10^5 habitantes de Rumanía.

Estos datos muestran que también en España, y en Europa, en este mismo periodo (2008-2012), la incidencia de TB ha disminuido aunque no de una manera tan notable como la ocurrida en Castellón, donde la tasa se redujo casi a la mitad (de 18 a 9,6).

Durante los 5 años del estudio, se diagnosticaron 320 casos de TB con cultivo positivo. Se considera que nuestra serie representa la situación real de la TB en la provincia, ya que supone el 82,7% de los casos declarados. La distribución de casos por año fue la siguiente: 74 en el año 2008; 83 en el 2009; 66 en el 2010; 56 en el 2011; y 41 en el año 2012. El número de casos con cultivo positivo ha ido disminuyendo de forma paralela a la incidencia, como era de esperar.

En nuestra provincia, gracias a los trabajos realizados de forma conjunta por un grupo multidisciplinar formado por neumólogos, microbiólogos y epidemiólogos, se ha podido analizar cómo ha ido evolucionando la TB desde el año 1992 (Moreno *et al.*, 1996; Marín *et al.*, 2000; Tirado *et al.*, 2006; Gil *et al.*, 2011).

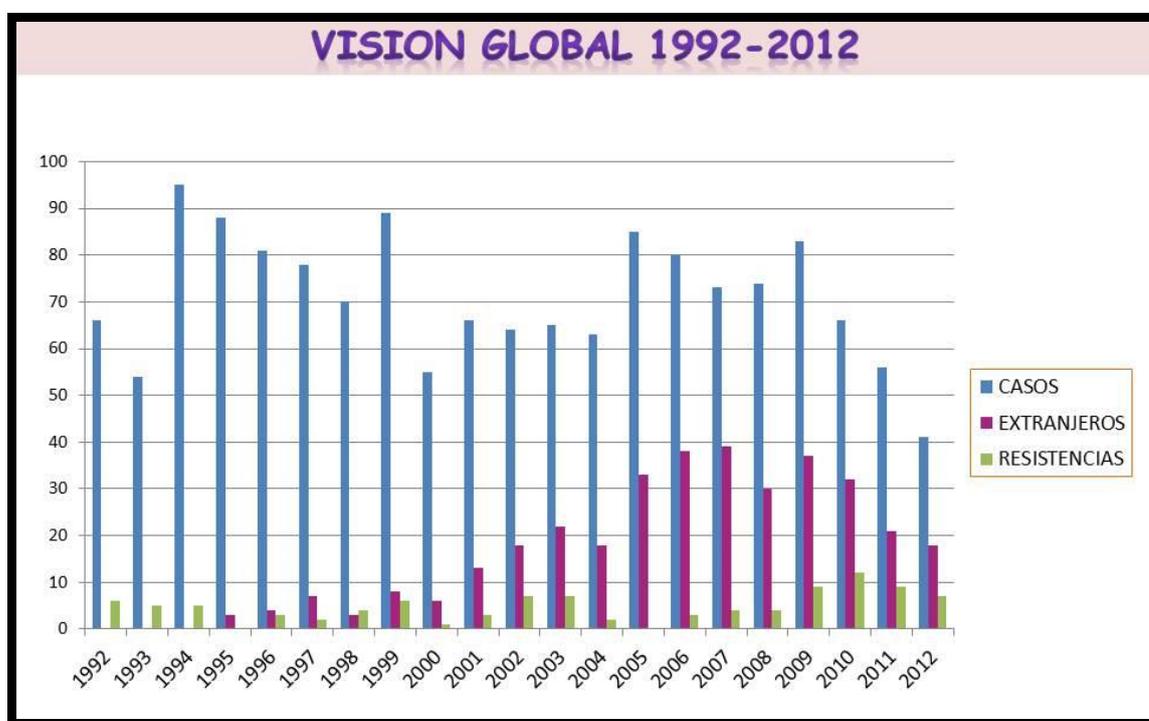


Figura 26: Tendencia en el número de casos de TB con cultivo positivo desde el año 1992 al 2012 en la provincia de Castellón.

Marín *et al.* (2000) diagnosticaron, en el periodo de 1992 a 1998, 532 casos de TB con cultivo positivo. En los dos primeros años se registraron 66 y 54 casos, respectivamente, números similares a los del final de nuestro estudio. Sin embargo, a medida que avanzaron los años, los autores informaron de un número de casos más elevado que en nuestra serie: 95 en 1994; 88 en 1995; 81 en 1996; 78 en 1997; y 70

en 1998. El periodo siguiente, de 1999 hasta el 2003, fue revisado por Tirado *et al.* (2006). En éste se detectaron 644 casos: 89 casos en el año 1999; 55 en el 2000; 66 en el 2001; 64 en el 2002; y 65 en el 2003. En ese estudio ya se observaba como los casos de TB comenzaban a disminuir. Gil *et al.* (2011) describen que en el periodo siguiente, de 2004 a 2007, se diagnosticaron 301 casos: 63 en el 2004; 85 en el 2005; 80 en el 2006; y 73 en el 2007. Durante este espacio de tiempo no hubo una tendencia definida (Figura 26).

En los últimos años, los cambios en la tasa de incidencia van muy unidos al problema de la inmigración y la TB se encuadra dentro del contexto que supone la globalización (Paliceo, 2005). En España, al igual que en otros países europeos, el incremento de la TB relacionada con el fenómeno migratorio se detecta en menor o mayor grado en todas las comunidades autónomas, soportando un mayor peso aquellas que presentan una mayor concentración de inmigrantes (Molina-Salas *et al.*, 2014). Nuestra provincia también se ha visto inmersa en este fenómeno. En el periodo estudiado, la población extranjera representaba el 43,7% (140/320) de los casos de TB con cultivo positivo, siendo las nacionalidades más frecuentes la rumana, con una proporción del 57,1%, y las procedentes del norte de África, con un 25,1%. Tirado *et al.* (2006), ya comentaban la influencia que supuso la inmigración en la evolución de la TB en Castellón, al reseñar que, en el periodo 1995-2003, la población extranjera había aumentado del 3,8% en el año 1995 al 33,8% en el 2003. El país de donde procedía la mayoría de los pacientes era Rumanía (36,9%), al igual que en nuestra serie. Marín *et al.* (2010), en un trabajo sobre lo que suponía la inmigración desde Rumanía en nuestra provincia, describen como durante el periodo 2004 al 2007 los casos de TB en españoles fueron disminuyendo de un 71,4% a un 53,1%. Sin embargo, la proporción de extranjeros aumentó de un 28,5% en el 2004 a un 46,9% del total en 2007. En ese periodo, el 64% de la población extranjera con TB también era rumana.

Con todo lo señalado, queda patente cómo el impacto de la inmigración ha influido en la dinámica de la TB en nuestra provincia. Todo ello ha ocurrido sobre todo, a expensas de la población rumana, que en el año 2008 suponía el 8,7% de la población total en la provincia de Castellón y que fue llegando de forma masiva debido a la amplia oferta de trabajo que había en el campo de la construcción, servicio doméstico y cerámica (Marín *et al.*, 2010).

La inmigración ha influido más en unas zonas que en otras de nuestro país. Según refieren Molina-Salas *et al.* (2014), durante los años 2004 al 2009 en el Área III de Salud de la Región de Murcia la proporción de población inmigrante de los casos con TB era del 67,9%, muy superior a la detectada en nuestra provincia. Sin embargo, Ballesteros *et al.* (2014) describen, que en dos áreas urbanas de Cataluña, durante los años 2001 al 2011, la población extranjera supuso el 36% del total de los casos de TB, cifras algo inferiores a las recogidas en nuestra provincia. En el Área de Salud Sur de Granada, zona receptora de población inmigrante procedente de países con alta incidencia de TB, se reseña que durante el periodo 2003-2010 ésta fue del 22,6%, pasando de ser menos de un 5% en el 2003 a un 50% en el 2010 (Morales-García *et al.*, 2015), observándose la misma influencia que en Castellón ha tenido el fenómeno migratorio en la evolución de la TB.

El Centro Nacional de Epidemiología publicó que el 31,2% de los casos de TB en el año 2012, correspondían a personas nacidas fuera de España (CNE, 2013). Los autores refieren que el número de extranjeros respecto del total de casos de TB varía mucho entre las diferentes comunidades autónomas: La Rioja (49%), Murcia (47%) y Cataluña y Madrid (con un 46% cada una) que son las que presentan mayor proporción; destacan que Extremadura y Galicia son las que tienen un menor número de extranjeros (1% y 7%, respectivamente). La proporción de nacidos fuera de España para la Comunidad Valenciana estaría sobre un 32,5%, inferior a la de nuestra provincia para ese mismo año.

Cuando se analiza la evolución de los casos declarados según el país de nacimiento, en el periodo 2005-2012, se observa como el número de casos ha ido aumentando hasta el año 2008, posiblemente debido a la mejora en la recogida de la información, y que, a partir de ese año, hay un descenso en ambos grupos, menos acusado en el grupo de extranjeros (CNE, 2013).

Hay que tener en cuenta, cuando se trata sobre datos de TB e inmigración en España, que hasta el año 2004 existían lagunas en la información en lo referente al número de casos declarados en personas nacidas fuera de España (Chaves & Íñigo, 2007). Parece ser que no había una adecuada conexión entre los registros autonómicos y las bases de datos de ámbito nacional. En el año 2004, el CNE, en su Boletín Epidemiológico, informaba que de los 7.766 casos de TB, 787 (10,1%) correspondían a personas nacidas fuera de España. Sin embargo, en ese mismo año

tres comunidades autónomas notificaron un total de 964 casos de TB en extranjeros, lo cual permitía comprobar que los registros no estaban completos. Afortunadamente este problema ha sido subsanando con los años, y cada vez las comunidades autónomas cumplimentan mejor las variables de declaración de la TB, tal y como puede observarse en el Informe Epidemiológico sobre la situación de la tuberculosis en España (CNE, 2013).

En un estudio multicéntrico, realizado entre el 1 de enero del 2006 y 31 marzo del 2007, en el que participaban 53 hospitales españoles, García-García *et al.* (2011) referían que de los 1.500 pacientes con TB, un 29,7% eran extranjeros procedentes mayoritariamente de Rumanía (13,9), Bolivia (13,5%), Marruecos (11,5%), Pakistán (9,5%), Ecuador (7,5%), Senegal (4,6%), Colombia (4,4%) y Perú (4,4%). La proporción de extranjeros de este trabajo es bastante inferior a la nuestra, que en el 2008 era del 40,5%. El porcentaje de casos procedentes de Rumanía, aun siendo la nacionalidad extranjera más prevalente, era muy inferior a la nuestra (63%).

Si nos centramos en las características de los pacientes con TB de nuestra serie, el 65% eran hombres y el 35% mujeres, siendo la razón hombre/mujer de 1,9. En los estudios previos realizados en Castellón, la proporción de hombres fue del 76,9% en el periodo 1992-1998 y la razón era 3,3 (Marín *et al.*, 2000); del 69,6% en el periodo 1995-2003 (Tirado *et al.*, 2006); y del 67% durante los años 2004-2007 (Gil *et al.*, 2011). Observamos como a lo largo del tiempo, la TB sigue siendo más frecuente en hombres, aunque la proporción de casos en mujeres ha ido aumentando en nuestra provincia.

El porcentaje en nuestra serie es similar a la descrita en Madrid por Álvarez-Castillo *et al.* (2011), para el periodo 1999-2004, en el que el porcentaje de hombres fue del 62,1%, y al referido por Giménez Durán *et al.* (2011), en las Islas Baleares del 63,7%. En un estudio multicéntrico de 32 hospitales españoles realizado durante los años 2010-2011, la razón fue 2,1 (Blanquer *et al.*, 2015).

Todos estos datos coinciden con los factores epidemiológicos reseñados en la literatura, donde se afirma que los hombres tienen mayor riesgo de enfermar, sobre todo a partir de determinadas edades (Caminero, 2003).

La media de edad de nuestros pacientes fue de 32,4 años (rango etario: 0 - 91). El grupo más afectado, representando el 60,6% del total, correspondió a los adultos

jóvenes; un 4,6% de los casos fueron en población infantil; y un 12,2% en mayores de 65 años.

Al contrastar nuestros datos con los publicados anteriormente en nuestra provincia, vemos que en el periodo 1992-1998 la edad media de los pacientes con TB fue superior a la nuestra (40,7 años), y que también la mayoría de los casos (55,4%) se concentró entre los 15 y 44 años; un 4,2% fueron menores de 14 años; y el porcentaje en el grupo de mayores de 65 años fue más alto (18,3%) (Marín *et al.*, 2000). En el estudio realizado por Tirado *et al.* (2006) durante los años 1995-2003, los pacientes tenían una edad media de 40,5 años, también superior a la de nuestra serie; el 60,9% se concentró en el grupo de edad entre 15 y 44 años; un 3,9% eran menores de 15 años; y un 15,5% eran mayores de 65. De 2004 a 2007, según señalan Gil *et al.* (2011), la edad media de los casos con TB fue de 42 años; un 65% tenían entre 16 y 45 años; un 2% era población infantil; y no podemos conocer cuántos eran mayores de 65 años puesto que estos autores analizaron los grupos de edad entre 46 y 75 años con un 25% de casos y mayores de 75 años con un 8%.

La media de edad de los casos de TB en Castellón, según nuestra experiencia, ha ido disminuyendo a lo largo del tiempo, aunque el grupo en el que se dan la mayoría de los casos sigue siendo el de adultos jóvenes (15-45 años), al igual que ocurre en otras series de nuestro país (Alvárez-Castillo *et al.*, 2011; Molina-Salas *et al.*, 2014; Blanquer *et al.*, 2015; Morales-García *et al.*, 2015). En los mayores de 65 años, en nuestra provincia, el número de casos ha ido disminuyendo, mientras que en la población infantil desde el año 1992 ha ido oscilando.

A nivel nacional, según el informe del año 2012 (CNE, 2013), también se concentran la mayoría de los casos de TB (48,9%) en el grupo de 15-44 años. Sin embargo, la proporción de pacientes mayores de 65 años es mayor que la nuestra (20,5%). El porcentaje de menores de 15 años fue de 6,3%, un poco más alta que nuestra serie.

Según se señala en el informe europeo (ECDC, 2014), la mayoría de los casos nuevos (44%) se concentró en el grupo de edad de entre los 25 y 44 años, siendo del 35,7% en los países de la Unión Europea (UE/EEE) y del 45,7% en los países no UE/EEE. La población infantil, en la UE/EEE, representó un 4,7% del total en el año 2012. Sin embargo, cabe señalar que la tendencia, durante el periodo 2006-2010, en toda la región europea, de la notificación global de TB en niños disminuyó en un 10%.

Desde la mitad la década de los 80, los adultos jóvenes han sido el grupo de edad más afectado, en gran parte debido a los enfermos con infección por VIH. No obstante, y aunque los casos de VIH han disminuido, el predominio en este grupo etario se mantiene debido al incremento de los casos de TB en el colectivo inmigrante (Balagué *et al.*, 2002).

De las encuestas epidemiológicas de las que se recogieron los factores de riesgo para desarrollar TB, se pudo conocer que el 29,4% de los casos presentaba al menos un factor de riesgo (FR). El alcoholismo, como único FR o asociado a otros, se presentó en el 17,2% de los pacientes, siendo el más frecuente. Los pacientes con infección por VIH representaron el 7,8% y un 5% de los casos tenían diabetes.

En nuestra provincia, la infección por el VIH en los enfermos tuberculosos fue, en los primeros trabajos, del 23,9% en el periodo 1992-1998 (Marín *et al.*, 2000), del 17,7% en el 1995-2003 (Tirado *et al.*, 2006); y del 7,3% en los años 2004-2007 (Gil *et al.*, 2011). Cabe señalar que, en Castellón, tras el elevado porcentaje de casos VIH positivos registrados, al principio de los años 90 se produce un descenso a partir de 1995, tendencia que se ha consolidado en años sucesivos, llegando hasta el periodo analizado en este trabajo a un 7,8%. Este descenso es atribuible a la instauración de la terapia antiretroviral de gran actividad (TARGA), a partir de la segunda mitad de los años 90, con la que se empezó a mejorar la situación inmunitaria de los pacientes, con lo que se ha conseguido reducir el desarrollo de la enfermedad tuberculosa en estos pacientes (Campos *et al.*, 2002).

Nistal *et al.* (2015), en un estudio multicéntrico, analizando la presencia de infección por VIH en pacientes ingresados en nuestro país por TB entre los años 2001 y 2011, describen que el 15,9% de casos tenían infección por VIH. También resaltaban que, a lo largo de los 10 años del estudio, el porcentaje de coinfectados disminuyó de un 19,8% en el 2001 a un 10,7% en el 2011. Además, Rojas-Marcos *et al.* (2015), durante el mismo periodo, estudian la presencia de diabetes también en los pacientes ingresados con diagnóstico de TB y encuentran que un 8,1% de los pacientes tenían esta enfermedad, observándose un fenómeno contrario al mencionado con el VIH, ya que la proporción aumentó de un 6,8% en el 2001 a un 10,2% en el 2011.

González-Moreno *et al.* (2013), en un hospital secundario, durante el periodo 2003-2011, refieren que el 11% eran VIH; el 3,2% tenían diabetes; y el 2,4% alguna neoplasia. En un estudio prospectivo realizado durante los años 1997-2008 en el

Hospital Ramón y Cajal, se reseña como el porcentaje de pacientes VIH disminuyó del 26% en los años 1997 a 2000 al 12% en los años 2005 a 2008 (Fortún *et al.*, 2011). Además se comenta otros factores de riesgo como el alcoholismo y diabetes, que presentaron porcentajes similares a los de nuestro estudio con 13,5% y 8,6%, respectivamente. En el informe nacional, se comunica que durante el año 2012, de los casos en los que se disponía de información acerca del estatus VIH en el momento del diagnóstico de TB, un 8,8% eran positivos (CNE, 2013).

El porcentaje de casos de TB hospitalizados en nuestro periodo (67,2%) ha disminuido en relación a los estudios previos realizados en nuestra provincia. De hecho, Marín *et al.* (2000) refieren un 85,5% de hospitalizaciones de los pacientes con TB en el periodo 1992-1998; y Tirado *et al.* (2006) un 80% durante 1995-2003. El porcentaje continúa siendo elevado, teniendo en cuenta que la hospitalización debería eludirse, sobretudo en casos de TB respiratorias no complicadas (March, 1989; Montes-Santiago *et al.*, 2010). En Castellón, podría ser que este número elevado de hospitalizaciones se deba a la ausencia de una consulta monográfica de TB en nuestro Departamento de Salud, como sí existe entre otras provincias, como Barcelona (UITB, 1999), Mallorca (González- Moreno *et al.*, 2013), Sevilla (Toral *et al.*, 2000) y Madrid (Soler *et al.*, 2009). Esto hace que se siga hospitalizando más de lo deseable ante la necesidad de controlar que se realicen las pruebas diagnósticas necesarias, supervisar la adherencia al tratamiento de pacientes problemáticos y la necesidad de asegurarse que se siguen las medidas de aislamiento.

Existen dos trabajos en España, publicados en los últimos años, donde se analiza, en uno de ellos, la epidemiología de las hospitalizaciones por TB en nuestro país (Culqui *et al.*, 2015) y, en el otro, el coste de éstas (Montes-Santiago *et al.*, 2010). En el primero se comenta como la tasa nacional de hospitalización por TB se redujo de 16,44 casos por 10⁵ habitantes en el año 1999 a 12 por 10⁵ habitantes en el año 2009. Las comunidades autónomas que mostraron valores más elevados en el año 2009 fueron Melilla y Ceuta, con tasas de 35,49 y 33,06, respectivamente, y las comunidades autónomas que, por el contrario, presentaron tasas de hospitalizaciones más reducidas fueron Canarias, Andalucía y Navarra con 5,75, 9,60 y 9,89 por 10⁵ habitantes respectivamente. La Comunidad Valenciana, en ese mismo año, no presentó una tasa muy elevada, ya que fue del 10,80. En el segundo trabajo, sobre los costes, los autores comentan que las TB respiratorias hospitalizadas constituyeron el 80,4% de todas las TB respiratorias declaradas por el Sistema EDO en el periodo 1999-2006, si

bien es cierto que se produjo un descenso medio anual en esos años del 3%. En el año 2006, el gasto de estas hospitalizaciones supuso 30,8 millones de euros. Teniendo en cuenta que bastantes ingresos hospitalarios fueron innecesarios, se podría haber evitado esa carga económica y sanitaria para nuestro país.

Esta misma reflexión nos hacemos los responsables del diagnóstico, tratamiento y control de la TB en Castellón y, aunque en los últimos 20 años haya habido una reducción en el número de hospitalizaciones, deberíamos intentar, en la medida de lo posible, reducir aún más estos ingresos evitables.

Por lo que se refiere a las formas clínicas, el 87,2% de nuestra serie presentaba TB pulmonar y el 12,8% extrapulmonar (EP). La forma EP predominante fue la ganglionar (5,9%), seguida de la pleural (2,5%) y genitourinaria (2,5%). Se dieron 3 casos (0,9%) de TB osteoarticular y 2 (0,6%) de TB miliar.

Analizando los datos de la TB según la localización anatómica, en las distintas publicaciones realizadas en nuestra provincia, observamos que, durante el periodo 1992-1998, la proporción de TB pulmonar fue de un 90,8% y la de la EP de un 9,2%, sin especificar localización anatómica en estas últimas (Marín *et al.*, 2000). En el trabajo realizado durante 1995-2003 no se especifica localización de la TB y en el último, realizado durante el periodo 2004-2007, Gil *et al.* (2011) sólo analizan la población que está en *cluster* y de ésta mencionan que un 88% de los pacientes presentaba TB pulmonar; un 6,1% pleural; un 3,5% linfática; y el 1,8% meníngea. Al comparar nuestros datos con los del primer periodo, vemos que la proporción de TB extrapulmonar en nuestra serie ha sido superior, de un 12,8%.

En nuestra provincia estamos muy por debajo del porcentaje de TB EP observado a nivel nacional, en torno a un 30% desde el año 2007, y que apenas ha variado a lo largo de los años, al contrario de lo que ocurre con la TB respiratoria (CNE, 2013).

En otros estudios realizados en nuestro país, las proporciones de TB EP son mucho mayores. En Asturias de un 38,7% (Servicio de Vigilancia epidemiológica de Asturias, 2013), mientras que en Mallorca, durante el periodo 2003-2011, la proporción de TB EP diagnosticadas fue de un 33,8% (González-Moreno *et al.*, 2013).

Según los datos reportados por el ECDC, en el año 2012 en los países de la UE/EEE, la localización EP tuvo un promedio del 13%, muy similar a la nuestra. Sin embargo, 10 países informaron cifras superiores, más de un 30% de sus casos de TB

tenían localización EP y 3 de ellos con un porcentaje superior al 40%, como Holanda (48,6%), Reino Unido (46,8%) y Suecia (40,3%).

5.2.- Sobre el estudio de sensibilidad

El estudio de sensibilidad fue realizado a las 320 cepas aisladas, resultando resistentes el 13,5% (41/320) de los aislamientos. Nuestro porcentaje fue muy superior a los referidos en los estudios previos de nuestra provincia, ya que Marín *et al.* (2000) refieren una resistencia del 4,7%, siendo un 3,9% en casos no tratados previamente y un 11,1% en casos con tratamiento previo. En cambio, Tirado *et al.* (2006) señalan que un 5% de los casos presentó resistencia a uno o más fármacos, un 4,6% era resistencia inicial (no tratados previamente) y un 6,7% en casos previamente tratados.

En los estudios anteriores, el porcentaje de resistencias siempre fue mayor en casos con tratamiento previo. Sin embargo, todas las resistencias del presente trabajo, como ya se ha comentado, se detectaron en pacientes que no habían sido tratados previamente, ni siquiera en población extranjera, lo que resulta especialmente llamativo. Aunque este dato resulte sorprendente, nos consta que la fuente de información es fiable, ya que procede de las encuestas epidemiológicas realizadas de forma exhaustiva e individualizada. La desaparición de las resistencias en casos tratados previamente podría atribuirse a una mayor adecuación de las pautas terapéuticas y a un mejor cumplimiento de éstas. Y, por otro lado, la proporción mayor de resistencias globales descritas en nuestro estudio podría deberse al menor número de casos de TB en dicho periodo.

Desde el año 2008 al 2012, la resistencia global frente a H fue de un 8,1% (26/320), muy superior a la descrita en los primeros años, 1992 a 1998, por Marín *et al.* (2000), que fue de un 3%, y a la referida por Tirado *et al.* (2006) durante 1995 y 2003, que recoge una resistencia a H del 4,3%. Hay que hacer notar que en el año 2010 la resistencia a H fue del 16,7%, cifra, nunca antes observada, en nuestra provincia, lo que ha contribuido a elevar el porcentaje total de nuestra serie. Este elevado porcentaje de resistencia a H se debió a la existencia de 2 brotes, detectados tras la realización de la técnica de epidemiología molecular, uno de 2 miembros y otro de 3, con cepas resistentes a H y a S.

De nuestras cepas, un 2,2% mostraron TB-MR y un 1,9% de éstas eran resistentes a los 5 fármacos de primera línea. Este porcentaje es algo más elevado a los descritos previamente en nuestra provincia, ya que se obtuvo un 1,1% (Marín *et al.*, 2000), un 0,5% (Tirado *et al.*, 2006) y un 1,4% (Marín *et al.*, 2010).

Para comparar con los datos nacionales, proporcionados en el Informe Epidemiológico de la TB en el año 2012 (CNE, 2013), debemos tener en cuenta que los datos no son extrapolables al total de casos de toda España, ya que las cepas que se reciben en el CNM no proceden de todas las comunidades autónomas. De las 871 cepas que recibieron, 50 (5,74%) fueron resistentes a H, dato muy inferior al nuestro. Por otra parte, en el Estudio RETUBES (Blanquer *et al.*, 2015), un trabajo prospectivo multicéntrico de pacientes con aislamiento de *M. tuberculosis* y antibiograma a fármacos de primera línea, en el que participaban 32 hospitales españoles durante los años 2010 y 2011, los autores refieren una resistencia global del 9,2%, del 6,7% a H, y que un 1,9% de los pacientes tuvo TB-MR, estos datos también son inferiores a los nuestros.

En un trabajo sobre la TB resistente en Castilla y León realizado durante el periodo 1996 a 2000 (Alberte-Castiñeiras *et al.*, 2006), también de 5 años, se refieren unas resistencias muy inferiores a las de nuestro estudio: del 3,8% a cualquier fármaco de primera línea; del 1,9% a H; y 1 caso (0.1%) de TB-MR. Todas estas resistencias eran en casos no tratados previamente, como en nuestro trabajo. Esa misma comunidad (Alberte-Castiñeiras *et al.*, 2010), durante los años 2000 a 2005, cifra sus resistencias globales en un 4,2%; un 3,2% a H; y 0,1% TB-MR.

En Málaga, en un estudio de resistencias que se realizó a 465 cepas procedentes de diferentes centros hospitalarios de la provincia, se obtuvo una resistencia aislada a H del 6,5%; a R del 1,3%; a S del 5,5%; a E del 0,4%; y a P del 5,8%. El 1,1% fueron TB-MR; el 2,2% presentaron resistencia combinada a I+S; y el 0,4% a I+E. Entre los pacientes que recibieron tratamiento previo, encuentran una resistencia a H del 10,7%, mientras que en los que no lo tomaron fue del 7,2% (Montiel *et al.*, 2011).

Según señalan Cucurrull *et al.* (2011), en un estudio amplio realizado entre los años 1996 a 2009 en la provincia de Girona, en los que se identificaron 1278 cultivos positivos, el 6,4% presentó resistencia a uno o más fármacos de primera línea y el 89% eran casos no tratados anteriormente. En Zaragoza, durante el periodo 2000 a 2012, en uno de los hospitales de referencia de la provincia se aislaron 758 cepas, de

las que un 11,5% fueron resistentes y un 0,92% mostraron MR (Garrido *et al.*, 2013). Otro estudio, que abarca 12 años (2001 a 2012), realizado en un hospital de Córdoba, muestra una resistencia a H de 7,2%; a S del 3,5%; a R del 3,4%; a P del 1,8%; a E del 1,1%; y un 1,8% de las cepas fueron MR (Gutiérrez *et al.*, 2014). En Mallorca, en el trabajo mencionado anteriormente sobre la experiencia de una consulta monográfica de TB, se dispuso del estudio de sensibilidad en 357 cepas, de las que un 4,8% (17/357) mostraron resistencia a H, todas ellas pertenecientes a pacientes que no habían recibido tratamiento previamente y el 1,1% (4/357) fueron TB-MR. De estas 4 MR, en 2 casos los pacientes si habían sido tratados previamente (González-Moreno *et al.*, 2013).

García-Rodríguez *et al.* (2011) señalan que, en el Área Sanitaria de La Coruña donde hay una consulta monográfica de TB, los datos de resistencia son muy bajos. Diagnosticaron 2.258 casos de TB desde 1991 hasta finales de 2010, con un 63,8% de cultivos positivos y se realizó el estudio de sensibilidad únicamente en el 58,8% de ellos. En 726 casos sin antecedentes de tratamiento previo, las resistencias fueron del 0,7% a H; de 0,4% a R; y 0,8% a S. Además, en 122 casos tratados previamente, de un 8,2% a H, de 4,9% a R, de 0,8% a S, y el 2,4% fueron cepas TB-MR. El periodo analizado no es comparable, ya que este estudio abarca 20 años.

En general, los porcentajes de resistencia publicados en otros estudios son inferiores a los obtenidos en la provincia Castellón y nos llama especialmente la atención la resistencia aislada a R y E, recogida por estos autores, ya que en nuestro caso no se detectó ninguna.

En nuestros pacientes, pudimos comprobar que la DR-TB fue algo más elevada en población extranjera (15,7%) que en españoles (10,6%). Esta proporción de DR-TB, más prevalente en inmigrantes, se recoge por primera vez en Castellón en el trabajo de Tirado *et al.* (2006), en donde la diferencia de resistencia entre españoles y extranjeros, en aquel periodo, era mucho más acusada, (3,7% vs 13,1%).

Rodrigo *et al.* (2010) también comunican esta diferencia en los resultados de un trabajo prospectivo de cohorte a nivel nacional, donde se analizan las características diferenciales de la TB en inmigrantes en España. Desde enero del 2006 al 31 de diciembre del 2007. Los autores reflejan que la resistencia total de las cepas a algún fármaco en la población autóctona fue del 7,9%, frente al 18,3% en inmigrantes. Otro artículo, presentado por Ballesteros *et al.* (2014), en el que se describen las

características de la tuberculosis en inmigrantes y autóctonos en dos hospitales de Cataluña, muestra también esta mayor proporción de resistencias (9,2% vs 5%) en la población extranjera. En el Área Sur de Granada, Morales-García *et al.* (2015), señalan que la población extranjera mostró un porcentaje superior al de los españoles (7,5% vs 5,8%).

Existen otros trabajos donde no hubo diferencia en las resistencias entre la población inmigrante y la autóctona (González-Moreno *et al.*, 2013) y otros donde el porcentaje de resistencias fue superior en españoles que en extranjeros (77% vs 23%)(Garrido *et al.*, 2013).

5.3.- Sobre la caracterización molecular

En el presente trabajo se ha llevado a cabo la caracterización molecular de 151 cepas de *M. tuberculosis* de las 163 que habían sido aisladas durante los años 2010 a 2012. Se planteó analizar 3 años, ya que la duración de un estudio de epidemiología molecular no debe ser inferior a 2 años, para no interpretar erróneamente un patrón único de DNA como una reactivación endógena (Seidler *et al.*, 2004; García-Pachón & Rodríguez, 2005).

De estas 151 cepas, el 56,3% pertenecían a pacientes españoles y el 43,7% a casos de nacionalidad extranjera. Para la caracterización molecular se utilizó un set de 15 loci MIRU-VNTR diseñado por Supply *et al.* (2006).

Se realizó un primer análisis tras amplificar el DNA de las cepas mediante electroforesis capilar, y cuando no se obtuvo resultado, se repitió el análisis mediante electroforesis en gel de agarosa; lo que ocurrió en el 22% (503/2265) de las determinaciones realizadas. La necesidad de utilizar otra técnica pudo deberse a que no partimos de DNA purificado, lo que pudo suponer alguna limitación en algún locus. El DNA se extrajo mediante un procedimiento de lisis térmica de acuerdo con el protocolo de varios autores (Allix *et al.*, 2004; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2009a).

Según nuestra experiencia, los loci que fallaron más fueron el VNTR 4156, el VNTR 4052 y, por último, el MIRU 42. En un estudio multicéntrico en el que participaron 37 laboratorios de 30 países (23 de Europa, 4 situados en Asia, 1 en Oceanía, 1 en África y 8 en América), se mostraban los resultados tras la tipificación mediante MIRU-VNTR de 30 muestras de DNA extraídas de 20 cepas de *M. tuberculosis* (10 de ellas eran de

la misma cepa) con el fin de conocer la reproducibilidad intra e inter-laboratorios (de Beer *et al.*, 2012). Los participantes dieron a conocer que los loci que más fallaban eran: los VNTR 4052 y 4156, y los MIRU 31 y 42 por este orden. Nuestro datos coinciden con los de estos autores excepto para el MIRU 31, que sólo requirió electroforesis en gel de agarosa en un 4,6% (7/2265) de las determinaciones, y el VNTR 4156, que no funcionó mediante electroforesis capilar, teniendo que realizar el 100% de las cepas por electroforesis de agarosa e incluso rediseñar los cebadores basándonos en la bibliografía (de Beer *et al.*, 2014).

En la presente investigación, con el método 15 MIRU-VNTR, se reportó un elevado poder de discriminación del 0.998, similar al obtenido por Alonso-Rodríguez *et al.* (2008), de un 0.995; al reportado en Uganda por Nabyonga *et al.* (2011) del 0,996; y superior al informado por Sola *et al.* (2003), de un 0.988, y por Nikolaevskii *et al.* (2005), que fue de un 0.747.

Cuando analizamos los índices de discriminación de diferentes loci vemos que, en particular, 9 de ellos mostraron un índice de discriminación elevado y fueron: los MIRU 10, 26, 40 y los VNTR 577, 2401, 3690, 2163b, 1955 y 4052. Hubo 5 que presentaron un índice de discriminación moderado (los MIRU 16, 32 y 42, y el VNTR 2165) y sólo el MIRU 4 fue el que mostró un bajo poder de discriminación. La mayoría de ellos coinciden con los resultados informados por otros autores (Sola *et al.*, 2003; Nikolaevskii *et al.*, 2005; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2008; Comas *et al.*, 2009). En la Tabla 22 se muestra la comparación de los resultados con el de otros trabajos.

La mayoría de estos estudios coinciden con nuestros resultados en que el MIRU 4 tiene un bajo poder de discriminación; que el MIRU 16, el 31 y el VNTR 53 tienen una moderada capacidad discriminante; y que los VNTR 47, 52, 1955, 2163b y 4052 lo tienen elevado. Además, todos ellos coinciden en que los MIRU 10 y 40 tienen un elevado poder discriminante.

El MIRU 4 (locus 580) tiene una capacidad de discriminación muy reducida para las cepas circulantes en nuestro entorno, lo que nos lleva a pensar que podría ser sustituido por otro en el set 15 loci MIRU-VNTR, como por ejemplo el MIRU 23 o el VNTR 3171 que, según Comas *et al.* (2009) y Alonso-Rodríguez *et al.* (2008), son loci moderadamente discriminantes.

LOCUS	ALIAS	Esta Tesis	Comas <i>et al.</i> , 2009	Alonso-Rodríguez <i>et al.</i> , 2008	Nicolaevskii <i>et al.</i> , 2005	Sola <i>et al.</i> , 2003
580	MIRU 4/ ETR-D	Bajo	Bajo	Bajo		Moderado
2996	MIRU 26	Elevado	Moderado	Moderado	Elevado	Elevado
802	MIRU 40	Elevado	Elevado	Elevado	Elevado	Elevado
960	MIRU 10	Elevado	Elevado	Elevado	Elevado	Elevado
1644	MIRU 16	Moderado	Moderado	Moderado		Moderado
3192	MIRU 31	Moderado	Moderado	Moderado	Elevado	Elevado
424	VNTR 42	Moderado	Elevado	Elevado		No analizado
577	VNTR 43 / ETR C	Elevado	Moderado	Elevado		Moderado
2165	ETR A	Moderado	Elevado	Elevado	Elevado	elevado
2401	VNTR 47	Elevado	Elevado	Elevado		No analizado
3690	VNTR 52	Elevado	Elevado	Elevado		No analizado
4156	VNTR 53 / QUB-4156	Moderado	Moderado	Moderado		No analizado
2163b	QUB-11b	Elevado	Elevado	Elevado		No analizado
1955	VNTR 1955	Elevado	Elevado	Elevado		No analizado
4052	QUB-26	Elevado	Elevado	Elevado		No analizado

Tabla 22: Comparación de nuestros resultados en cuanto al poder de discriminación con el resto de trabajos revisados.

Las 151 cepas caracterizadas dieron lugar a 134 patrones diferentes. En concreto, 122 cepas tenían patrón único, lo que significa que un 78,2% pertenecían a casos de reactivaciones de infecciones antiguas, y 29 (19,2%) cepas estaban agrupadas en 12 *clusters*, con lo que durante el periodo 2010 a 2012 hubo una tasa de transmisión reciente de un 11,3%. Cabe decir que este estudio presenta una pequeña limitación, puesto que no se pudieron recuperar la totalidad de las 163 cepas aisladas durante esos 3 años, aunque se trata de una serie muy representativa ya que se obtuvieron datos del 92,6%.

No hubo ningún *cluster* con un número elevado de casos, como sí ocurre en otros trabajos realizados en algunas áreas de nuestro país (Safi *et al.*, 1997; Borrell *et al.*, 2010). Las agrupaciones contenían de 2 a 4 miembros, lo que parece indicar que la

infección reciente en nuestra provincia se está produciendo en pequeños brotes o microepidemias. Este hecho podría reflejar la eficiencia del ECC y de las medidas preventivas, quimioprofilaxis primaria o TITL, que se aplican inmediatamente en cuanto se localiza un posible contacto.

Con el ECC se sospechó la existencia de 7 brotes durante este periodo. La aplicación de la técnica de epidemiología molecular 15 MIRU-VNTR permitió documentar 5 de estos brotes, ya que en 2 de ellos no se pudo recuperar las cepas. Pero, además, permitió detectar 7 brotes más que no habían sido sospechados por las técnicas epidemiológicas clásicas, probablemente por ser contactos esporádicos. Una limitación del presente estudio es que no se ha podido reencuestar a los pacientes, por lo que no hemos podido llegar a confirmar la posible relación epidemiológica. Pese a ello, la caracterización molecular de las cepas mejora claramente la investigación de la transmisión de la TB, permite encontrar nuevas rutas y, además contribuye a completar el ECC como se muestra en éste y en diversos trabajos. Por ejemplo, Borrell *et al.* (2009) comparan los resultados mediante la epidemiología clásica con los que se obtienen tras la aplicación de métodos de caracterización molecular y refieren que estos últimos detectan 65 agrupaciones, mientras que el ECC consigue 44. Asimismo, Solsona *et al.* (2001) constatan que en una serie de 44 pacientes, que por ECC no habían sido considerados que pudieran formar parte de brotes, pues vivían solos, la aplicación de técnicas moleculares demostró que el 50% estaban agrupados.

La mayoría de los trabajos publicados en España referentes a la transmisión de la TB han sido realizados mediante la técnica de RFLP. La mayor parte de éstos describen unas tasas, o porcentajes de agregación, más elevadas que las encontradas en nuestra provincia y el número de casos agrupados en algunos brotes es también, en ocasiones, mayor.

Existe un trabajo previo al nuestro en Castellón sobre la transmisión de la TB (Gil *et al.*, 2011) en el que se informaba que, durante el periodo 2004 a 2007 (4 años), hubo un porcentaje de agregación del 40%, obtenido tras la caracterización de 286 cepas por RFLP. Describen la existencia de 40 brotes de 2 a 6 miembros. En este trabajo, según el ECC, al 85 % de los pacientes en *cluster* se les había considerado como casos aislados y sólo el 15 % referían contacto con tuberculosos. Creemos que esta proporción de casos agrupados es tan elevada comparada a la nuestra (19,2%) por varios motivos. En primer lugar, la duración del estudio, que fue de un año más.

Además, en aquel periodo, el número de casos por año del estudio con cultivo positivo fue mayor y, finalmente, el uso exclusivo del método de RFLP puede sobrestimar el número de *cluster* y la transmisión reciente. Son varios los autores que afirman que el RFLP no siempre es un indicador fiable de la vinculación epidemiológica de los pacientes (van Deutekom *et al.*, 2005; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2009b). En vista de la diferencia de los resultados en cuanto a la transmisión reciente y en el número de miembros de las agrupaciones, y aun teniendo en cuenta los factores antes mencionados, consideramos que en la provincia de Castellón se llevan a cabo cada vez mejor las medidas de control en la transmisión de la TB.

Safi *et al.* (1997), en un estudio de 3 años en la ciudad de Sevilla, refirieron un porcentaje de agregación por RFLP del 38%; lo cual coincide con los datos de Íñigo-Martínez *et al.* (2000, 2003) en Madrid, quienes encontraron un 42% de cepas agrupadas, tras caracterizar por RFLP y *spoligotyping*. En un trabajo sobre la transmisión reciente, en un área de baja incidencia como Segovia, Elizaga *et al.* (2002) observaron un porcentaje de agrupación del 28%, también realizado mediante RFLP y *spoligotyping*. Existen trabajos españoles en los que se describe un porcentaje de agrupación superior al 50% (Ruiz-García *et al.*, 2002; Cacho *et al.*, 2005), aunque esta proporción tan elevada parece ser debida a la duración de esta investigación (de 7 a 10 años) y esto hace que se aumente el porcentaje de casos en *cluster*.

En un trabajo presentado por Borrell *et al.* (2008), realizado durante los años 2003 y 2004 mediante RFLP, se refiere que la tasa de transmisión reciente en la ciudad de Barcelona fue de un 12,09%, similar a la nuestra.

En un estudio realizado durante 3 años y medio (mayo 2009 a diciembre 2012), en un centro hospitalario de referencia de Andalucía, se estudiaron por 15 MIRU-VNTR, 109 cepas procedentes de 5 provincias andaluzas, detectándose 21 brotes con un total de 57 casos, lo que correspondía a una tasa de transmisión del 33% (González-Galán *et al.*, 2013).

En Europa encontramos países donde el porcentaje de transmisión reciente es bajo, al igual que ocurre en nuestra provincia, como es el caso de Suiza, con un 17% de casos en *cluster* (Fenner *et al.*, 2012); de Londres (Maguire *et al.*, 2002), con una tasa de transmisión del 14,4% y un porcentaje de agregación del 22,7%; y de Noruega, donde Heldal *et al.* (2003) publican una proporción de pacientes en *cluster* del 17,5%. Sin embargo, la mayoría de estudios reportan un porcentaje de agrupación mayor,

como el de van Soolingen *et al.* (1999) en Holanda, con un 46,2%; el descrito por Moro *et al.* (2002) en Milán, con una tasa de transmisión de un 28,1%, y una proporción de casos en *cluster* del 44,1%; y el de Diel *et al.* (2005) que informan en Alemania un porcentaje de agrupación del 33,7%.

Para poder suplir las limitaciones y las discrepancias del RFLP, aunque se ven minimizadas cuando se complementa con el *spoligotyping*, se propició el desarrollo de la técnica 15 MIRU-VNTR. Esta técnica es un método altamente reproducible, necesita menos cantidad de DNA y tiene menor tiempo de respuesta que el RFLP, método hasta hace poco considerado como *gold estándar* en epidemiología molecular de TB. La técnica 15 MIRU-VNTR, tiene un poder discriminatorio similar al del RFLP, éste especialmente en zonas de baja incidencia, lo que le convierte en el método molecular de primera línea más eficiente (Hawkey *et al.*, 2003; van Deutekom *et al.*, 2005; Allix *et al.*, 2006; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2008). Por todo ello, nos ha resultado interesante aplicar esta técnica por primera vez en nuestra población.

Los estudios poblacionales de epidemiología molecular de la TB han puesto repetidamente de manifiesto que la transmisión reciente en España es mayor en la población autóctona que en la inmigrante, como ocurre en el de como el de Íñigo *et al.* (2007), con un 41,9% vs 27,1%, y el de Borrell *et al.* (2010), con un 44,6% vs el 28,8%. En nuestra provincia, durante los años estudiados, cabe señalar que también se ha observado esta tendencia, aunque la diferencia no alcance significación estadística, con un 21,2% de españoles en *cluster* vs un 16,6% de extranjeros. El mismo fenómeno se ha descrito fuera de España, en Houston, Londres y Noruega (de Bruyn *et al.*, 2001; Maguire *et al.*, 2002; Haldal *et al.*, 2003). Asimismo, en una revisión de 36 estudios de epidemiología molecular realizados en 17 países, se señala que el hecho de ser nativo sería un factor de riesgo para formar parte de un *cluster* (Fok *et al.*, 2008). En base a lo comentado, cabría pensar que la mayoría de los extranjeros desarrollarían la enfermedad principalmente por reactivación de una infección adquirida en su país de origen, hecho que también describen otros autores (Diel *et al.*, 2004; Borrell *et al.*, 2010).

El 25% de agrupaciones en nuestro estudio eran mixtas, formadas por pacientes españoles y extranjeros. También en Castellón, Gil *et al.* (2011) refieren un 30% de brotes formados por población extranjera y autóctona, algo superior al de nuestro periodo. En otros trabajos realizados en España, se muestran cifras similares o

superiores: un 50% de *clusters* mixtos descritos por Íñigo *et al.* (2007); un 53% referido por Alonso-Rodríguez *et al.* (2009b) ambos en Madrid; y un 33,8% según Borrell *et al.* (2010) en Barcelona. Todo ello parece indicar que, en España, la población extranjera está totalmente integrada con la nacional, al contrario de lo que ocurre en otros países europeos con bajas tasas de incidencia, donde no parece que haya tanta integración como muestran los datos de Dhale *et al.* (2007) en Noruega, con un 12% de *clusters* mixtos, y Lillebaek *et al.* (2002) en Dinamarca, que, con un 59% de casos de TB en población extranjera, describen que prácticamente no hay transmisión entre éstos y la población nativa.

Cuando analizamos los pacientes en *cluster*, llama la atención que 8 (27,6%) de los casos tuvieron la baciloscopia negativa. Tradicionalmente, los pacientes no bacilíferos han sido considerados menos infecciosos, aunque algunos autores comunican que éstos son capaces de transmitir la infección (Hernández-Garduño *et al.*, 2004; Sanz *et al.*, 2006). Curiosamente, en el trabajo realizado previamente, en nuestra provincia, por de Gil *et al.* (2011) mediante RFLP, el porcentaje fue el mismo (27%). Sin embargo, en Elche los autores publican cifras muy superiores (42,3%) de baciloscopias negativas (Ruiz-García *et al.*, 2002). En un estudio realizado por Tostmann *et al.* (2008) en Holanda, donde intentan determinar el papel que juegan los pacientes con baciloscopia negativa y con cultivo positivo en la transmisión de la TB; comentan que una posible explicación es que para poder visualizar una baciloscopia al microscopio se requiere una carga bacilar de 5.000-10.000 por mL. Sin embargo, una infección puede producirse con un número menor de bacilos. Otra explicación estaría relacionada con la realización de la técnica, el tipo de tinción y la experiencia del observador de las que depende la sensibilidad. Por otro lado, este hecho también se ve influido por las características de los pacientes: los niños y los pacientes VIH positivos suelen tener baciloscopia negativa. Estos autores refieren que la transmisión de TB en casos con baciloscopia negativa en Holanda es de un 12,6% y recomiendan que en el estudio de contactos se tenga en cuenta a estos pacientes como posibles fuentes de transmisión. En nuestro estudio, de los 8 casos con baciloscopia negativa al menos 1 era un probable caso índice.

Aunque diversos autores definen las cepas resistentes como menos transmisibles y, por tanto, con menor tendencia a formar *clusters* (van Soolingen *et al.*, 1999; García-García *et al.*, 2000; Burgos & Pym, 2002), de las 29 cepas agrupadas, en nuestro caso, hubo un 27,6% (8/29) que mostraron resistencia a algún fármaco de

primera línea. Además, de estas cepas resistentes, 4 estaban agrupadas en 2 brotes que se dieron en el año 2010, lo cual explicaría el aumento del porcentaje de la resistencia global observado este año.

Las formas extrapulmonares de los pacientes agrupados fueron anecdóticas en nuestra serie, al contrario de lo que describieron otros autores (Ruíz-García *et al.*, 2002; Gil *et al.*, 2011) En concreto, Hernández-Garduño *et al.* (2004) refieren en un estudio de epidemiología molecular en Vancouver, que cuando incluyen los casos de TB extrapulmonar, la tasa de transmisión aumenta.

Pudimos comprobar, al comparar nuestros casos en *cluster* con los que presentan patrones huérfanos, que no hubo prácticamente diferencias en cuanto a la proporción de hombres y mujeres en los dos grupos. Dentro del grupo de casos agrupados hubo un mayor porcentaje de menores de 15 años, mayor proporción de baciloscopias positivas y resistencias. Sin embargo, en el grupo con patrones únicos, aquellos con TB por reactivación de una infección antigua, los pacientes presentaban en mayor medida factores de riesgo.

Tras la caracterización molecular de las cepas aisladas en el periodo 2010 a 2012, los resultados obtenidos en la presente Tesis, permiten afirmar que la tasa de transmisión reciente en la provincia de Castellón es baja en comparación con estudios previos. Pensamos que las medidas en el control de la transmisión de la TB son cada vez mejores. Destacamos la estrecha relación existente entre clínicos, microbiólogos, epidemiólogos y preventivistas en Castellón. De hecho, una comunicación fácil, fluida y rápida, ha propiciado un abordaje multidisciplinar de la infección que lleva a que se pongan en marcha cuanto antes las medidas de control y tratamiento. Además, la Red de Vigilancia Microbiológica de la Comunidad Valenciana (RedMIVA), creada en el año 2007, y que recoge diariamente a tiempo real todos los resultados microbiológicos de la red de hospitales de la Comunidad, permite recuperar todos los casos de TB con cultivo positivo, aunque no hayan sido declarados previamente, con lo que el porcentaje de pacientes con TB no declarados es cada vez menor en nuestra Comunidad.

En nuestra opinión, y dado que la causa principal de la TB es la infección latente, se debería intensificar las medidas en la prevención de la reactivación en población con factores de riesgo tales como, diabetes, silicosis, insuficiencia renal crónica, neoplasias, alcoholismo, adicción a drogas por vía parenteral e infección por VIH. En los últimos

años, la población en la que se está reforzando las medidas de prevención frente a la TB son el grupo de pacientes que van a recibir terapias inmunosupresoras (transplantados y terapia anti-TNF). Las distintas sociedades científicas (Dermatología, Reumatología, Nefrología, Digestivo, etc.) han ido incorporando a sus protocolos el diagnóstico de la infección tuberculosa latente (ITL), recurriendo a nuevas herramientas diagnósticas como el estudio del IGRA.

Aunque consideramos que el control de la TB en la provincia de Castellón se está llevando a cabo de una forma sistemática y satisfactoria, siempre se podría mejorar, asegurando un marco de calidad y eficiencia asistencial. Pensamos que la implementación de una Unidad Especializada en Tuberculosis contribuiría a agilizar el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de los pacientes y en consecuencia abarataría los costes. Además, nos permitiría participar en estudios multicéntricos de TB con otras unidades ya creadas en nuestro país.

Además, la incorporación de técnicas de epidemiología molecular de una forma sistemática contribuiría a mejorar el conocimiento de las cadenas de transmisión de la TB y ayudaría a optimizar las medidas de control.

6.- CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, como respuesta a los objetivos marcados, permiten extraer las conclusiones siguientes:

1. En el periodo analizado, del año 2008 al 2012, se ha observado una tendencia decreciente en las tasas de TB en la provincia de Castellón, hecho que coincide con el número de casos con cultivo positivo, los cuales, fueron disminuyendo a partir del año 2009.
2. Aunque el número de extranjeros en los dos últimos años del estudio ha sido menor, la proporción de los mismos no ha disminuido, siendo aún en el 2012 de un 43,9%, demostrando la influencia que sigue teniendo este grupo de población en la TB de Castellón.
3. El número de hospitalizaciones, y el coste que conllevan, sigue siendo elevado, a pesar de que ha disminuido con respecto a otros periodos estudiados. Creemos en la necesidad de crear una Unidad Especializada de TB, como existe en otras provincias, para poder realizar un mejor seguimiento de ciertos pacientes sin tener que ingresarlos en el hospital.
4. La resistencia global detectada es muy superior a lo que se observó en estudios previos en nuestra provincia. Los valores detectados de resistencia global a isoniazida refuerzan las recomendaciones de la OMS de tratar a los pacientes con asociación de 4 fármacos en los dos primeros meses.
5. El porcentaje elevado de resistencia a isoniazida en el año 2010 nos hacía sospechar que pudiera haber habido algún brote. Este hecho se confirmó con la tipificación molecular.
6. La técnica 15 MIRU-VNTR, con un elevado índice de discriminación, ha resultado una herramienta útil en el estudio de transmisión reciente en nuestra provincia. Los loci con mayor poder de discriminación en nuestra

serie han sido: MIRU 26, MIRU 40, MIRU 10, VNTR 577, VNTR 2401, VNTR 3690, VNTR 2163b, VNTR 1955 y el VNTR 4052. Consideramos que éstos deberían constar siempre en el panel de tipificación molecular de TB en nuestro entorno.

7. La aplicación de la técnica de epidemiología molecular 15 MIRU-VNTR ha permitido detectar siete brotes que no habían sido considerados mediante el ECC, probablemente por deberse a contactos esporádicos.

8. Y, por último, la baja tasa de transmisión reciente obtenida hace pensar que las medidas de control adoptadas han permitido disminuir la diseminación de la enfermedad en nuestra provincia. En consecuencia, se considera oportuno que los esfuerzos vayan destinados a aplicar medidas para prevenir la reactivación en la población de riesgo, sin olvidarse, en modo alguno, del control de la transmisión.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Abebe F, Bjune G.** The emergence of Beijing family genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* and low-level protection by bacille calmette-guerin (BCG) vaccines: Is there a link? *Clin Exp Immunol* **2006**; 145: 389-397.
- Alberte-Castiñeiras A, Brezmes-Valdivieso MF, Campos-Bueno A, Montes-Martínez I, López-Medrano R, Avellaneda C, Pérez-Pascual P, Della-Latta P.** Drug-resistant tuberculosis in Castilla-León, Spain, 1996-2000. *Int J Tuberc Lung Dis* **2006**; 10: 554-558.
- Alberte-Castiñeiras A, Campos-Bueno A, López-Urrutia L, Álvarez-Alonso E, Megías G, Ojeda-Fernández E, López-Medrano R, Iglesias-García J.** Resistencias a fármacos de *Mycobacterium tuberculosis* en la Comunidad de Castilla y León (España), 2001-2005: tercer estudio multicéntrico. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2010**; 28: 706-709.
- Alcaide F, Esteban J, González J, Palacios JJ.** Micobacterias. En: Procedimientos en Microbiología Clínica, nº 9. Cercenado E, Cantón R. Recomendaciones de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Madrid. **2005**.
- Alland D, Kalkut E, Moss AR, McAdam RA, Hahn JA, Bosworth W, Drucker E, Bloom BR.** Transmission of tuberculosis in New York City: an analysis by DNA fingerprinting and conventional and molecular methods. *N Engl J Med* **1994**; 330: 1710-1716.
- Allix C, Supply P, Fauville-Dufaux M.** Utility of Fast Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number Tandem Repeat Genotyping in clinical Mycobacteriological Analysis. *Clin Infect Dis* **2004**; 39: 782-789.
- Allix C, Walravens K, Saegerman C, Godfroid J, Supply P, Fauvill-Dufaux M.** Evaluation of the epidemiological relevance of Variable-Number Tandem-Repeat Genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism analysis and Spoligotyping. *J Clin Microbiol* **2006**; 44: 1951-1962.
- Allix-Béguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S.** Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* **2008**; 46: 2692-2699.
- Alonso V, Paul R, Barrera L, Ritacco V.** Falso diagnóstico de tuberculosis por cultivo. *Medicina (Buenos Aires)* **2007**; 67: 287-294.
- Alonso-Rodríguez N, Martínez-Lirola M, Herránz M, Sánchez-Benítez M, Barroso P, INDAL-TB group, Bouza E, García de Viedma D.** Evaluation of the advanced 15-loci MIRU-VNTR genotyping tool in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology studies. *BMC Microbiol* **2008**; 8: 34.

Alonso-Rodríguez N, Martínez-Lirola M, Sánchez ML, Herranz M, Peñafiel T, Bonillo MC, González-Rivera M, Martínez J, Cabezas T, Díez-García LF, Bouza E, García de Viedma D. 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* **2009a**; 47: 2026-2032.

Alonso-Rodríguez N, Chaves F, Íñigo J, Bouza E, García de Viedma D, TB molecular epidemiology study Group of Madrid. Transmission permeability of tuberculosis involving immigrants, revealed by a multicentre analysis of clusters. *Clin Microbiol Infect* **2009b**; 15: 435-442.

Álvarez-Castillo MC, Jonsson J, Herrera D. Evaluación del control de la tuberculosis en un área de la Comunidad de Madrid, España (1999-2004). *Gac Sanit* **2011**; 25: 127-132.

American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* **2000**; 161: 1376-1395.

American Thoracic Society, Centers for Disease Control and Prevention, Infectious Diseases Society of America. Controlling tuberculosis in the United States. *Am J Respir Crit Care Med* **2005**; 172: 1169-1227.

B

Balagué M, Orcau A, Sánchez P, Tortajada C, Caylà J. Epidemiología actual de la tuberculosis en España: hacia una mejor vigilancia y control. *Control Calidad Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. **2002**.

Ballesteros AL, Oriol J, Francisco I, Fernández S, García F, Vinyes A. Características clínicas de la tuberculosis incidente en inmigrantes y autóctonos, en 2 hospitales de Cataluña (2000-2011). *Rev Clin Esp* **2014**; 214: 445-452.

Bandera A, Gori A, Catozzi L, Esposti AD, Marchetti G, Molteni Ch, Ferrario G, Codecasa L, Penati V, Matteelli A, Franzetti F. Molecular epidemiology study of exogenous reinfection in an area with a low incidence of tuberculosis. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 2213-2218.

Barnes PF, Yang Z, Preston-Martin S, Pogoda JM, Jones BE, Oyata M, Eisenach KD, Knowles L, Harvey S, Cave MD. Patterns of tuberculosis transmission in Central Los Angeles. *JAMA* **1997**; 278: 1159-1163.

Barnes PF, Cave MD. Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med* **2003**; 349:1149-56.

Bartels, P. Tuberkulos (Wirbelkaries) in der jüngeren Steinzeit. *Arch Anthropol* **1907**; 34: 243-255.

- Bifani PJ, Mathema B, Liu Z, Maghazen SL, Shopsin B, Tempalski B, Dricol J, Frothingham R, Musser JM, Alcabes P, Kreiswirth BN.** Identification of a W variant outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* via population-based molecular epidemiology. *JAMA* **1999**; 282: 2321-2327.
- Blanquer R, Rodrigo T, Casals M, Ruiz J, García-García JM, Calpe JL, Valencia E, Pascual T, Mir I, Jiménez MA, Cañas F, Vidal R, Penas A, Caylá JA y Grupo de Trabajo del Programa Integrado de Investigación en Tuberculosis en España.** Resistencia a fármacos antituberculosos de primera línea en España durante 2010-2011. Estudio RETUBES. *Arch Bronconeumol* **2015**; 51: 24-30.
- Borgdorff MW, Nagelkerke N, Van Soolingen D, De Hass PE, Veen J, Van Embden JD.** Analysis of tuberculosis transmission between nationalities in the Netherlands in the period 1993-1995 using DNA fingerprinting. *Am J Epidemiol* **1998**; 147: 187-195.
- Borrell S, Español M, Cardiel M, March F, Jansà JM, Orcau A, Alcaide F, Martín N, Salvado M, Coll P, González J.** Transmisión de la tuberculosis en la ciudad de Barcelona. Influencia de los nuevos inmigrantes. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2008**; 26 (Especial Congreso): 250.
- Borrell S, Español M, Orcau A, Tudó G, March F, Caylà JA, Jansà JM, Alcaide F, Martín-Casabona N, Salvadó M, Martínez JA, Vidal R, Sánchez F, Altet N, Coll P, González-Martón J.** 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**. 47: 198-204.
- Borrell S, Español M, Orcau A, Tudó G, March F, Caylà JA, Jansà JM, Alcaide F, Martín-Casabona N, Salvadó M, Martínez JA, Vidal R, Sánchez F, Altet N, Rey E, Coll P, González-Martón J.** Tuberculosis transmission patterns among Spanish and foreign-born populations in the city of Barcelona. *Clin Microbiol Infec* **2010**; 16: 568-574.
- Bos KI, Harkins KM, Coscolla M, Weber N, Comas I, Forrest SA, Bryant JM, Harris SR, Schuenemann VJ, Campbell TJ, Majander K, Wilbur AK, Guichon RA, Wolfe Steadman DL, Cook DC, Nieman S, Behr MA, Zumarraga M, Bastida R, Huson D, Nieselt K, Young D, Parkhill J, Buikstra JE, Gagneux S, Stone AC, Krause J.** Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. *Nature* **2014**; 514: 494-497.
- Brudney K, Dobkin J.** Resurgent tuberculosis in New York City. Human immunodeficiency virus, homelessness, and the decline of tuberculosis control programs. *Am Rev Respir Dis* **1991**; 144: 745-749.
- Burgos MV, Pym AS.** Molecular epidemiology of tuberculosis. *Eur Respir J* **2002**; 20: 54s-65s.

Burgos M, DeRiemer K, Small P, Hopewell PC, Daley CL. Effect of drug-resistance on the generation of secondary cases of tuberculosis. *J Infect Dis* **2003**; 188: 1878-1884.

Burgos MV, Méndez JC, Ribon W. Molecular epidemiology of tuberculosis: methodology and applications. *Biomédica* **2004**; 24: 188-201.

Burman WJ, Reves RR. Review of false-positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis* and recommendations for avoid unnecessary treatment. *Clin Infect Dis.* **2000**; 31: 1390-1395.

C

Cacho J, Astray J, Pérez M, Ramos A, Hernando M, Sánchez M, Domínguez JR, Gómez AB, Samper S, Martín C. Ten-year population based molecular epidemiological study of tuberculosis transmission in the metropolitan area of Madrid, Spain. *Int J Tuberc Lung Dis* **2005**; 9: 1236-1241.

Caminero JA. Guía de la Tuberculosis para Médicos Especialistas. Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER). París. Imprimerie Chirat. **2003**.

Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, Rodríguez JC, Afonso O, Martín C, Pavón JM, Torres MJ, Burgos M, Cabrera P, Small PM, Enarson DA. Exogenous reinfection with tuberculosis on a European island with a moderate incidence of disease. *Am J Respir Crit Care Med* **2001a**; 163: 717-720.

Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, Rodríguez JC, García T, Cabrera P, Lafoz C, Samper S, Takiff H, Afonso O, Pavón JM, Torres MJ, van Soolingen D, Enarson DA, Martín C. Epidemiological evidence of spread of a *Mycobacterium tuberculosis* strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island. *Am J Respir Crit Care Med* **2001b**; 164: 1165-1170.

Campos F, Muñoz F, Umbría S, Reyes N, De la Cruz I, Nogales MC. Evolución de la incidencia de la tuberculosis en el Área Sur de Sevilla en la década de los noventa. *Arch Bronconeumol* **2002**; 38: 214-220.

Cartes JC. Breve historia de la tuberculosis. *Revista médica de Costa Rica y Centroamérica.* LXX **2013**; 655: 145-150.

Cave AJE. The evidence for the incidence of tuberculosis in ancient Egypt. *Br J Tuberc* **1939**; 33: 142-152.

Cayla JA, Orcau A. Study of contacts in the XXI century: innovations are needed. *Med Clin (Barc)* **2003**; 121: 494-495.

CNE. Centro Nacional de Epidemiología. Informe epidemiológico sobre la situación de la tuberculosis en España. Año 2012. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. **2013**.

- Chaves F, Dronda F, Alonso-Sanz M, Noriega AR.** Evidence of exogenous reinfection and mixed infection with more than one strain of *Mycobacterium tuberculosis* among Spanish HIV-infected inmates. *AIDS* **1999**; 13:615-620.
- Chaves F, Iñigo J.** Tuberculosis e inmigración en España. *Rev Esp Salud Pública* **2007**; 81: 585-587.
- Chiang CY, Riley LW.** Exogenous reinfection in tuberculosis. *Lancet Infect Dis* **2005**; 5: 629-636.
- Collins DM, de Lisle GW.** DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *J Gen Microbiol* **1984**; 130: 1019-1021.
- Coll F, McNERNEY R, Guerra-Assusção JA, Glynn JR, Perdigão J, Viveiros M, Portugal I, Pain A, Martin N, Clark TG.** A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Nat Commun* **2014**; 5: 4812.
- Comas I, Gagneux S.** The past and future of tuberculosis research. *PLoS Pathogens*. **2009**; 5: e1000600.
- 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.
- Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M, Parkhill J, Malla B, Berg S, Thwaites G, Yeboah-Manu D, Bothamley G, Mei J, Wei L, Bentley S, Harris SR, Niemann S, Diel R, Aseffa A, Gao Q, Young D, Gagneux S.** Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with humans. *Nat Genet* **2013**; 45: 1176-1182.
- Cucurull J, Follia N, Camps N, Sabater M, Vega S, Vinyes A, Colomer J, Bisbe V, Massabeu A, Martén A, Subira N, Molina S.** Resistencias a los fármacos antituberculosos en la provincia de Girona durante los años 1996-2009. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2011**; 29 (Especial Congreso): 307.
- Culqui DR, Rodríguez-Valín E, Martínez de Aragón M.** Epidemiología de las hospitalizaciones por tuberculosis en España: análisis del conjunto mínimo básico de datos 1999-2009. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2015**; 33: 9-15.
- Cummings KJ.** Tuberculosis control: challenges of an ancient and ongoing. *Public Health Rep.* **2007**; 122: 683-692.

D

- Dale JW, Brittain D, Cataldi AA, Cousins D, Crawford J.T, Driscoll J, Heersma H, Lillebaek T, Quitugua T, Rastogi N, Skuce RA, Sola C, van Soolingen D, Vincent V.** Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex recommendations for standardised nomenclature. *Int J Tuberc Lung Dis* **2001**; 5: 216-219.

- Daley CL.** Molecular Epidemiology: A tool for understanding control of tuberculosis transmission. *Clin Chest Med* **2005**; 26: 217-231.
- Daniel TM.** The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out? *Int J Tuberc Lung Dis* **2000a**; 4:395–400.
- Daniel TM.** Pioneers of medicine and their impact on tuberculosis. University of Rochester Press, Rochester, NY. **2000b**.
- Daniel TM.** Robert Koch and the pathogenesis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* **2005**; 9:1181-1182.
- Daniel TM.** The history of tuberculosis. *Respir Med* **2006**; 100: 1862-70.
- de Beer JL, van Soolingen D.** Multilocus variable numbers of tandem repeats typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. Manual-VNTR typing (RIVM). **2012**.
- de Beer JL, Kremer K, Ködmön C, Supply P, van Soolingen D and the Global Network for the Molecular Surveillance of Tuberculosis 2009.** First worldwide proficiency study on Variable-Number-Tandem-Repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microbiol* **2012**; 50: 662-669.
- de Beer JL, Akkerman O W, Schürch AC, Mulder A, Van der Werf TS, Van der Zanden AGM, Van Ingen J, Van Soolingen D.** Optimization of standard in-house 24-Locus Variable-Number Tandem-Repeat typing for *Mycobacterium tuberculosis* and its direct application to clinical material. *J Clin Microbiol*, **2014**; 52: 1338 –1342.
- de Boer AS, Borgdorff MW, de Haas PE, Nagelkerke NJ, van Embden JD, van Soolingen D.** Analysis of rate of change of IS6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based on serial patient isolates. *J Infect Dis* **1999**; 180: 1238–1244.
- de Bruyn G, Adams GJ, Teeter LD, Soini H, Musser JM, Graviss EA.** The contribution of ethnicity to *Mycobacterium tuberculosis* strain clustering. *Int J Tuberc Lung Dis* **2001**; 5: 633-641.
- Dhale UR, Eldholm V, Winje BA, Mannasaker T, Heldal E.** Impact of immigration of the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in a low-incidence country. *Am J Respir Crit Care Med* **2007**; 176: 930–935.
- Diel R, Rüsç-Gerdes S, Niemann S.** Molecular epidemiology of tuberculosis among immigrants in Hamburg, Germany. *J Clin Microbiol* **2004**; 42: 2952–2960.
- Diel R, Seidler A, Nienhaus A, Rüsç-Gerdes S, Niemann S.** Occupational risk of tuberculosis transmission in a low incidence área. *Respir Res* **2005**; 6: 35.
- Dillon JR, Rahman M and Yeung KH.** Discriminatory power of typing schemes based on Simpson´s index of diversity for *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* **1993**; 31: 2831-2833.

Doig C, Seagar AL, Watt B, KJ Forbes. The efficacy of the hat killing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Pathol **2002**; 55: 778-779.

E

Eliazaga J, Carrero P, Íñigo J, Chaves F. Transmisión reciente de la tuberculosis en un área con baja incidencia: estudio epidemiológico y molecular. Med Clin (Barc) **2002**; 118: 645-649.

ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance in Europe 2008. Stockholm: ECDC; **2010**.

ECDC: European Center for Disease Prevention and Control /WHO Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2014. Stockholm: ECDC; **2014**.

F

Farga V. La conquista de la tuberculosis. Rev Chil Enf Respir **2004**; 20: 101-108.

Farga V, Caminero JA. Tuberculosis. Editorial Mediterráneo Ltda. 3ª edición. Santiago de Chile. **2011**.

Fenner L, Gagneux S, Helbling P, Battegay M, Rieder HL, Pfyffer GE, Zwahlen M, Furrer H, Siegrist HH, Fehr J, Dolina M, Calmy A, Stucki ID, Jatón K, Janssens JP, Stalder JM, Bodmer T, Ninet B, Böttger EC, Eggera M for the Swiss HIV Cohort and Molecular Epidemiology of Tuberculosis Study Group. *Mycobacterium tuberculosis* transmission in a country with low tuberculosis incidence: Role of immigration and VIH. J Clin Microbiol **2012**; 50: 388-395.

Ferebee SH. Controlled chemoprophylaxis trials in tuberculosis. A general review. Bibl Tuberc **1970**; 26: 28-106.

Fernández-Cuenca F. Aplicación de técnicas de PCR en la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. Enferm Infecc Microbiol Clin **2004**; 22: 355-360.

Fernández-Cuenca F, López-Cerero L, Pascual-Hernández A. Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. Enferm Infecc Microbiol Clin **2013**; 31: 20-25.

Filliol I, Driscoll JR, Van Soolingen D, Kreiswirth BN, Kremer K, Valetudie G, Ahn DD, Barlow R, Banerjee D, Bifani PJ, Brudey K, Cataldi A, Cooksey RC, Cousins DV, Dale JW, Dellagostin OA, Drobniowski F, Engelmann G, Ferdinand S, GascoyneBinzi D et al. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. Emerg Infect Dis **2002**; 8: 1347-1349.

Fok A, Numata Y, Schulzer M, FitzGerald MJ. Risk factors for clustering of tuberculosis cases: a systematic review of population-based molecular epidemiology studies. Int J Tuberc Lung Dis **2008**; 12: 480-492.

Fortún J, Martín-Dávila P, Navas E, López-Vélez R, Pintado V, Cobo J, González A, Bonilla M, Aneiros V, Gómez-Mampaso E, Moreno S. Changes in the epidemiology of tuberculosis: the influence of international migration flows. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2011**; 29: 654-659.

G

Gagneux S, Burgos MV, DeRiemer K, Enciso A, Muñoz S, Hopewell PC, Small PM, Pym AS. Impact of bacterial genetics on the transmission of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* **2006**; 2: e61.

García de Viedma D, Marín M, Hernangómez S, Díaz M, Ruiz Serrano MJ, Alcalá E. Tuberculosis recurrences: reinfection plays a role in a population whose clinical/epidemiological characteristics do not favor reinfection. *Arch Intern Med* **2002**; 162: 1873-1879.

García-García ML, Ponce de León A, Jiménez-Corona ME, Jiménez-Corona A, Palacios-Martínez M, Balandrano-Campos S, Ferreyra-Reyes L, Juárez-Sandino L, Sifuentes-Orsonio J, Oliveira-Díaz H, Valedespino-Gómez JL, Small PM. Clinical consequences and transmissibility of tuberculosis in southern Mexico. *Arch Intern Med* **2000**; 160: 360-366.

García-García JM, Blanquer R, Rodrigo T, Caylà JA, Vidal R, Casals M, Ruiz-Manzano J, the Working Group on Completion of Tuberculosis treatment in Spain. Social, clinical and microbiological differential characteristics of tuberculosis among immigrants in Spain. *PLoS ONE* **2011**; 6: e16272.

García-Pachón E, Rodríguez JC. Epidemiología molecular de la tuberculosis: principales hallazgos y su aplicación en España. *Arch Bronconeumol* **2005**; 41: 618-624.

García-Rodríguez JF, Vilariño-Maneiro L, Álvarez-Díaz H, Méndez-Lage S, Mariño-Callejo A, Lorenzo-García MV, Pérez del Molino ML, Sesma-Sánchez P. Resistencias de *M. tuberculosis* en un área sanitaria con un buen programa de prevención y control de la tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2011**; 29 (Especial Congreso): 294.

Garrido AI, Salvo S, González-Domínguez M, Sanjoquín I, Vitoria A. Estudio de las resistencias de *M. tuberculosis* en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza durante el periodo 2000-2012. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2013**; 31 (Especial Congreso): 222.

Geng E, Kreiswirth B, Driver C, Li J, Burzynski J, DellaLatta P, LaPaz A, Schluger NW. Changes in the transmission of tuberculosis in New York City from 1990 to 1999. *N Engl J Med* **2002**; 346: 1453-1458.

- Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat**, edit. Manual de estudio convencional de contactos y tratamiento de la infección latente en la tuberculosis. Centro Prevención y Control de la Tuberculosis. Valencia: Generalitat Valenciana; **2002**.
- Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat**, edit. Guía para la vigilancia y el control de la tuberculosis. Valencia: Generalitat Valenciana; **2007**.
- Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat**. Informe de Tuberculosis de la Comunitat Valenciana, año 2008. Informe de Salud Nº 115. Generalitat, Conselleria de Sanitat; **2009**.
- Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat**. Informe de Tuberculosis de la Comunitat Valenciana, año 2009. Informe de Salud Nº 120. Generalitat, Conselleria de Sanitat; **2010**.
- Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat**. Informe de Tuberculosis de la Comunitat Valenciana, año 2010. Informe de Salud Nº 130. Generalitat, Conselleria de Sanitat, **2011**.
- Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat**. Informe de Tuberculosis de la Comunitat Valenciana, año 2011. Informe de Salud Nº 134. Generalitat, Conselleria de Sanitat; **2012**.
- Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat**. Informe de Tuberculosis de la Comunitat Valenciana, año 2012. Informe de Salud Nº 143. Generalitat, Conselleria de Sanitat; **2013**.
- Gil M, Moreno R, Marín M, Romeu MA, Gomila B, González F**. Influencia de la inmigración en los patrones de la transmisión de la tuberculosis en Castellón (2004-2007). *Gac Sanit* **2011**; 25: 122-126.
- Giménez Durán J, Galmés Truyols AM, Herrera Guibert D, Bonilla Vargas LA, Luque Fernández MA, Bosch Isabel C, Nicolau Riufort A, Caylà Buqueras J**. Vigilancia de la tuberculosis en las Islas Baleares y caracterización de los casos infradeclarados entre los años 2005 y 2007. *Gac Sanit* **2011**; 25: 84-86.
- Glynn JR, Bauer J, De Boer AS, Borgdorff MW, Fine PE, Godfrey-Faussett P, Vinnycky E**. Interpreting DNA fingerprint clusters of *Mycobacterium tuberculosis*. European concerted action on molecular epidemiology and control of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* **1999**; 3: 1055-1060.
- Godfrey-Fausset P, Sonnenberg P, Shearer SC, Bruce MC, Mee C, Morris L, Murray J**. Tuberculosis control and molecular epidemiology in a South Africa goldmining community. *Lancet* **2000**; 356: 1066-1071.
- González-Martín J, García-García JM, Anibarro L, Vidal R, Esteban J, Blanquer R, Moreno S, Ruiz-Manzano J**. Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2010**; 28: 297.e1–97.e20.

- González-Galán V, Torres MJ, Aznar J.** Estudio molecular de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la utilización de la técnica MIRUs-VNTR en el Centro de Referencia Hospital Universitario Virgen del Rocío (2009-2012). *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2013**; 31 (Especial Congreso): 245.
- González-Moreno J, García-Gasalla M, Cifuentes C, Mir I, Pareja A, Navarro V, Serrano A, Pérez MC, Payeras A.** Experiencia de una unidad monográfica de tuberculosis: primeros 500 casos. *Arch Bronconeumol* **2013**; 49: 421-426.
- Goulding JN, Stanley J, Saunders N, Arnold C.** Genome-sequence-based fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **2000**; 38: 1121-1126.
- Grzybowski S, Allen EA.** History and importance of scrofula. *Lancet* **1995**; 346: 1472-1474.
- Gutiérrez M, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omais B, Marmiesse M, Supply P, Vicent V.** Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* **2005**; 1: 55-56.
- Gutiérrez J, Ruíz-Martínez P, Causse del Rio M, Bañon R.** Prevalencia de las resistencias a antituberculosos de 1ª línea en Córdoba. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2014**; 32 (Especial Congreso): 170.

H

- Haas DW, Des Prez, Roger M.** *Mycobacterium tuberculosis*. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editores. *Principles and Practice of infectious diseases*. Nueva York: **1995**; 2:217.
- Hawkey PM, Smith EG, Evans J, Monk O, Bryan G, Mohamed H, Bardhan M, Pugh RN.** Micobacterial Interspersed Repetitive Unit typing of *Mycobacterium tuberculosis* compared to IS6110-based Restriction Fragment Length Polymorphism analysis for investigation of apparently clustered cases of tuberculosis. *J Clin Microbiol* **2003**; 41: 3514-3520.
- Heldal E, Dahle UR, Sandven P, Caugant DA, Brattaas N, Waaler HT, Enarson DA, Tverdal A, Kongerud J.** Risk factors for recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur Respir J* **2003**; 22: 637-642.
- Hernández-Garduño E, Cook V, Elwood RK, Black WA, FitzGerald JM.** Transmission of tuberculosis from smear negative patients: a molecular epidemiology study. *Thorax* **2004**; 59: 286-290.
- Hunter PR, Gaston MA.** Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* **1988**; 26: 2465-2466.

Huys G, Rigouts L, Chemlal K, Portaels F, Swings J. Evaluation of amplified fragment length polymorphism analysis for inter- and intraspecific differentiation of *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, and *Mycobacterium ulcerans*. *J Clin Microbiol* **2000**; 38: 3675–3680.

I

Íñigo J, Arce A, Martín-Moreno JM, Herruzo R, Palenque E, Chaves F. Recent transmission of tuberculosis in Madrid: application of capture-recapture analysis to conventional and molecular epidemiology. *Int J Epidemiol* **2003**; 32: 763-769.

Íñigo J, García de Viedma D, Arce A, Palenque E, Alonso N, Rodríguez E. Analysis of changes in recent tuberculosis transmission patterns after a sharp increase in immigration. *J. Clin Microbiol* **2007**; 45: 63-69.

Íñigo-Martínez J, Chaves Sánchez F, Arce Arnáez A, Alonso Sanz M, Palenque Mataix E, Jaén Herreros F, Martínez Martínez MT, Gómez García M, Rodríguez Noriega A. Transmisión reciente de la tuberculosis en Madrid: utilidad de las técnicas moleculares. *Med Clin (Barc)* **2000**; 115: 241-245.

Iseman MD, Bentz RR, Fraser RI, Locks MO, Ostrow JH, Sewell EM. Guidelines for the investigation and management of tuberculosis contacts. *Am Rev Respir Dis* **1976**; 114: 459-463.

J

Janssen P, Coopman R, Huys G, Swings J, Bleeker M, Vos P, Zabeau M, Kersters K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiol* **1996**; 142: 1881–1893.

Jasmer RM, Hahn JA, Small PM, Daley CL, Behr MA, Moss AR, Creasman JM, Schechter GF, Paz EA, Hopewell PC. Molecular epidemiologic analysis of tuberculosis trends in San Francisco, 1991–1997. *Ann Intern Med* **1999**;130: 971–978.

K

Kamerbeek J, Shouls L, Kolk A, Van Agterved M, Van Soolingen D, Kuijper S, Bunshoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, Van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* **1997**; 35: 907-914.

Kassama Y, Shemko M, Shetty N, Fang Z, Macintire G, Gant V, Zumla A, Goodacre R. An improved fluorescent amplified fragment length polymorphism method for typing *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **2006**; 44: 288-289.

Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PWM, Martin C, Palittapongarnpim P, Plikaytis BB, Riley LW, Yakrus MA, Musser JM, van Embden JDA. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* **1999**; 37: 2607-2618.

Kwara A, Schiro R, Cowan L, Hyslop N, Wiser M, Harrison S, Kissinger P, Diem L, Crawford J. Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* **2003**; 41: 2683-2685.

Koch R. Die aetiologie der tuberculose, a translation by Berna Pinner and Max Pinner with an introduction by Allen K. Krause. *Am Rev Tuberc* **1932**; 25: 285-323.

Kontsevaya IS, Nikolayevsky VV, Balabanova YM. Molecular epidemiology of tuberculosis: objectives, methods, and prospects. *Mol Genet Microbiol Virol* **2011**; 26: 1-9.

Kubica G, Dye WE, Cohn ML, Middlebrook G. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* **1963**; 87: 775-779.

L

Lalvani A, Pathan AA, Durkan H, Wilkinson KA, Whelan A, Deeks JJ, Reece WH, Latif M, Pasvol G, Hill AV. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet* **2001**; 357: 2017-2021.

Lawn SD, Zumla AI. Tuberculosis. *Lancet* **2011**; 378: 57-72.

Lillebaek T, Andersen AB, Dirksen A, Smith E, Skougaard LT, Kok-Jensen A. Persistent high incidence of tuberculosis in immigrants in a low-incidence country. *Emerg Infect Dis* **2002**; 8: 679-684.

M

Maguire H, Dale JW, McHugh TD, Butcher PD, Gillespie SH, Costetsos A, Al-Ghusein H, Holland R, Dickens A, Martston L, Wilson P, Pitman R, Strachan D, Drobniewski FA, Banerjee DK. Molecular epidemiology of tuberculosis in London 95-97 showing low rate of active transmission. *Thorax* **2002**; 57: 617-622.

March P. ¿Dónde tratar nuestros tuberculosos?. *Arch Bronconeumol* **1989**; 25: 249-251.

- Marín M, González F, Moreno R, Pardo F, Prada P, Arnedo A, Aguar MC.** Evolución de las resistencias a tuberculosis en la provincia de Castellón. Años 1992-1998. Arch Bronconeumol **2000**; 36: 551-556.
- Marín M, Moreno R, Fortuño M, Bueso MJ, Romeu MA, González F.** Impacto de la inmigración desde Rumanía en la tuberculosis de un área mediterránea. Enf Emerg **2010**; 12: 115-120.
- Martín A, Herranz M, Ruiz M, Bouza E, García D.** Rapid clonal analysis of recurrent tuberculosis by direct MIRU-VNTR typing on stored isolates. BMC Microbiol **2007**; 7: 7.
- Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN.** Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. Clin Microbiol Rev **2006**; 19: 658-685.
- Molina-Salas Y, Lomas-Campos MM, Romera-Guirado FJ, Romera-Guirado MJ.** Influencia del fenómeno migratorio sobre la tuberculosis en una zona semiurbana. Arch Bronconeumol **2014**; 50: 325-331.
- Montes-Santiago J, Fernández C, Rey G, Mediero G.** Hospitalizaciones por tuberculosis en España: análisis de sus costes. Enferm Infecc Microbiol Clin **2010**; 28: 358-361.
- Montiel N, Bermúdez P, Fernández F, Sánchez MA, Acosta F, Martín L, Pérez MJ.** Estudio de resistencias frente a los distintos antibióticos de cepas aisladas de *Mycobacterium tuberculosis* complex en la provincia de Málaga. Enferm Infecc Microbiol Clin **2011**; 29 (Especial Congreso): 296.
- Morales-García C, Parra-Ruiz J, Valero-Aguilera B, Sanbonmatsu-Gámez S, Sánchez-Martínez JA, Hernández-Quero J.** Características de la tuberculosis en la población inmigrante en el Área de Salud Sur de Granada. Enferm Infecc Microbiol Clin **2015**; 33: 166-172.
- Moreno R, González F, Pardo F, Soler JA, Prada PL.** Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* en la provincia de Castellón. Arch Bronconeumol **1996**; 32: 118-121.
- Moro ML, Salamina G, Gori A, Penati V, Sachetti R, Mezzetti, Infuso A, Sodano L.** Two years population based molecular epidemiological study of tuberculosis transmission in the metropolitan area of Milan, Italy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **2002**; 21: 114-122.
- Morse D, Brothwell DR, Ucko PJ.** Tuberculosis in ancient Egypt. Am Rev Respir Dis **1964**; 90: 524-541.
- Murray M, Alland DA.** Methodological problems in the molecular epidemiology of tuberculosis. Am J Epidemiol **2002**; 155: 565-571.

N

Nabyonga L, Kateete D, Katabazi F, Odong PR, Whalen CC, Dickman KR, Moses JL. Determination of circulating *Mycobacterium tuberculosis* strains and transmission patterns among pulmonary TB patients in Kawempe municipality, Uganda, using MIRU-VNTR. *BMC Research Notes* **2011**; 4: 1-6.

Narayanan S. Molecular epidemiology of tuberculosis. *Indian J Med Res* **2004**; 120: 233-247.

Nguyen LN, Gilbert GL, Marks GB. Molecular epidemiology of tuberculosis and recent developments in understanding the epidemiology of tuberculosis. *Respir* **2004**; 9: 313-319.

Nikolaevskii VV, Balabanova IaM, Brown T, Drobniowski FA, Fedorin IM. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains circulating in central Russia: efficiency of spoligotyping and VNTR-MIRU. *Mol Gen Mikrobiol Virusol* **2005**; 4: 9-14.

Nistal S, Álvarez de Espejo T, Asenjo M, Vicente C, Asenjo A, Sendín V, Caamaño O, Barba R. Tuberculosis y VIH: Evolución en pacientes ingresados entre 2001 y 2011 en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2015**; 33 (Especial Congreso): 366.

O

OMS (Organización Mundial de la Salud). Alianza Alto a la Tuberculosis y Organización Mundial de la Salud. Plan para detener la tuberculosis 2006-2015. Ginebra. Organización Mundial de la Salud; **2006**.

P

Paliceo G. Globalización y tendencias actuales de la salud mundial. En: *Globalización y Salud*. Madrid: Sanidad Pública; **2005**. P. 27-40.

Parrish NM, Dick JD, Bishai WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* **1998**; 6: 107-112.

Pfyffer GE, Strassle A, Rose N, Wirth R, Brandli O, Shang H. Transmission of tuberculosis in the metropolitan area of Zurich: a 3 year survey based on DNA fingerprinting. *Eur Respir J* **1998**; 11: 804-808.

Pym AS, Domenech P, Honore N, Song J, Deretic V, Cole ST. Regulation of catalase-peroxidase (*KatG*) expression, isoniazid sensitivity and virulence by furA of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **2001**; 40: 879-889.

Pym AS, Saint-Joanis B, Cole ST. Effect of *KatG* mutations on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission in humans. *Infect Immun* **2002**; 70: 4955-4960.

R

- Reed MB, Gagneux S, Deriemer K, Small PM, Barry CE 3rd.** The W-beijing lineage of *Mycobacterium tuberculosis* overproduces triglycerides and has the DosR dormancy regulon constitutively upregulated. *J Bacteriol* **2007**; 189: 2583-2589.
- Rodrigo T, Caylà JA, García JM, Blanquer R, Caminero JA, Vidal R, Ruiz J, Casal M.** La cambiante endemia tuberculosa en España: características diferenciales de la tuberculosis en inmigrantes. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2010**; 28 (Especial Congreso): 463.
- Rodríguez E, Hernández G, Villarubia S, Díaz O, Tello O.** Casos de tuberculosis declarados a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. España, 2008. *Bol Epidemiol Semanal* **2009**; 17: 121-124.
- Rojas-Marcos J, Nistal S, Álvarez de Espejo T, Angelina M, Yebra M, Martín Ríos MD, Barba R.** Tuberculosis y diabetes: Evolución en pacientes ingresados entre 2001 y 2011 en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2015**; 33 (Especial Congreso): 368.
- Ross BC, Raios K, Jackson K, Dwyer B.** Molecular cloning of highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J Clin Microbiol* **1992**; 30: 942-946.
- Rothschild B, Martin LD, Lev G, Bercovier H, Bar-Gal GK, Greenblatt C, Donoghue H, Spigelman M, Brittain D.** *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present. *Clin Infect Dis* **2001**; 33: 305-311.
- Ruddy M, McHugh TD, Dale JW, Banerjee D, Maguire H, Wilson P, Drobniowski F, Butcher P, Gillespie SH.** Estimation of the rate of unrecognized cross-contamination with *Mycobacterium tuberculosis* in London microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* **2002**; 40: 4100-4104.
- Ruiz M, Rodríguez JC, Rodríguez-Valera F, Royo G.** Amplified-Fragment Length Polymorphism as a complement to IS6110-Based Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **2003**; 41: 4820-4822.
- Ruiz-García R, Rodríguez JC, Navarro JF, Samper S, Martín C, Royo G.** Molecular epidemiology of tuberculosis in Elche, Spain: a 7-year study. *J Med Microbiol* **2002**; 51: 273-277.

S

- Sacula A.** BCG: who were Calmette and Guerin? *Thorax*. **1983**; 38: 806-812.

- Safi H, Aznar J, Palomares JC.** Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated during a 3-year period (1993-1995) in Seville, Spain. *J Clin Microbiol* **1997**; 35: 2472-2476.
- Salo W, Aufderheide AC, Buikstra J, Holcomb TA.** Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc Natl Acad Sci USA* **1994**; 91: 2091-2094.
- Sanz O, Caminero JA, Pérez JL.** Tuberculosis e inmigración en España. Evidencias y controversias. *Med Clin (Barc)* **2006**; 126: 259-69.
- Sauret J.** La cura sanatorial de la tuberculosis. *Enf Emerg* **2001**; 3: 199-205.
- Seidler A, Niehaus A, Diel R.** The transmission of tuberculosis in the light of new molecular biological approaches. *Occup Environ Med* **2004**; 61: 96-102.
- Singh S P, Salamon H, Lahti C J, Farid-Moyer M, Small P M.** Use of pulsed-field gel electrophoresis for molecular epidemiologic and population genetic studies of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **1999**; 37: 1927-1931.
- Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, Schechter GF, Daley CL, Schoolnik GK.** The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods in the 1990s. *N Engl J Med* **1994**; 330: 1703-1709.
- Soini H, Pan X, Teeter L, Musser JM, Graviss EA.** Transmission dynamics and molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 217-221.
- Sola C, Filliol I, Legrand E, Lesjean S, Locht C, Supply P, Rastogi N.** Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infect Genet Evol* **2003**; 3: 125-133.
- Soler L, García MA, Jaras MJ, Vidal JL, López O, Noguerado A.** Análisis de la población atendida en una unidad de tuberculosis en Madrid. Evolución e impacto de la inmigración desde 1997 a 2006. *Rev Clin Esp* **2009**; 209: 467-477
- Solsona J, Caylá JA, Verdú E, Estrada MP, García S, Roca D, Miguel B, Coll P, March F, Cooperative Group for Contact Study of Tuberculosis Patients in Ciutat Vella.** Molecular and conventional epidemiology of tuberculosis in an inner city district. *Int J Tuberc Lung Dis* **2001**; 5: 724-731.
- Supply P.** Multilocus variable number tandem repeat genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* technical guide. **2005**.
- Supply P, Lesjean E, Savine K, Kremer K, Van Soolingen D, Locht C.** Identification of novel intergenic repetitive units in a Mycobacterial two component system operon. *Mol. Microbiol* **1997**; 26: 991-1003

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: 762-771.

Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C. Automated highthroughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 3563-3571.

Supply P, Allix C, Lesjean S, Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, Savine E, De Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifaurepina N, Van Soolingen D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **2006**; 44: 4498-4510.

T

Takashima T, Iwamoto T. New era in molecular epidemiology of tuberculosis in Japan. *Kekkaku* **2006**; 81: 693-707.

Tirado MD, Moreno R, Marín M, González F, Pardo F, García del Busto A, Prada P. Impacto de la inmigración en las resistencias de *Mycobacterium tuberculosis* en la provincia de Castellón. *Med Clin (Barc)* **2006**; 126: 761-764.

Tison F, Carbonnelle B. Recherche, isolement et étude du bacille tuberculeux et des autres mycobactéries en pratique courante. Crouan et Roques, Lille. **1972**.

Toman K (ed). What were the main landmarks in the development of tuberculosis chemotherapy? En: "Tuberculosis case-finding and chemotherapy questions and answers". WHO, Geneva. **1979**; 75-76.

Toral J, del Castillo D, Carpio V, González MA, Peñafiel M. Unidad monográfica de tuberculosis: experiencia de 7 años de funcionamiento. *Arch Bronconeumol* **2000**; 36: 191-196.

Tostmann A, Kik SV, Kalisvaart NA, Sebek MM, Suzanne V, Boeree MJ, van Soolingen. Tuberculosis transmission by patients with smear-negative pulmonary tuberculosis in a large cohort in The Netherlands. *Clin Infect Dis* **2008**; 47: 1135-1142.

U

UITB (Grupo de Estudio de Contactos de la Unidad de Investigación en Tuberculosis de Barcelona). Documento de consenso sobre el estudio de contactos en los pacientes tuberculosos. CONFERENCIA DE CONSENSO. *Med Clin (Barc)* **1999**; 112: 151-156.

V

- van Deutekom H, Supply P, de Haas PEW, Willery E, Hoijng S, Locht C, Coutinho RA, van Soolingen D.** Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by Microbacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Analysis, a more accurate method for identifying epidemiological links between patients with tuberculosis. *J Clin Microbiol* **2005**; 43: 4473-4479.
- van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martín C, McAdam R, Schinnick TM, Small PM.** Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* **1993**; 31: 406-409.
- van Rie A, Warren R, Richardson M, Victor TC, Gie RP, Enarson DA, Beyers N, van Helden PD.** Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N Engl J Med* **1999**; 341: 1174-1179.
- van Soolingen D, Borgdorff MW, de Haas P, Sebek MMGG, Veen J, Dessen M, Kremer K, van Embden JDA.** Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nationwide survey from 1993 through 1997. *J Infect Dis* **1999**; 180: 726-736.
- Veen J.** Microepidemics of tuberculosis: The stone-in-the-pond principle. *Tuber Lung Dis* **1992**; 73: 73-76.
- Vidal R, Cayla JA, Gallardo J, Lobo A, Martín C, Ordobas M, Ruiz J, Vázquez R. Grupo de trabajo del área TIR de SEPAR.** Recomendaciones SEPAR. Normativa sobre la prevención de la tuberculosis. *Arch Bronconeumol* **2002**; 38: 441-451.

W

- Walker TM, Ip CL, Harrell RH, Evans JT, Kapatai G, Dediccoat MJ, Eyre DW, Wilson DJ, Hawkey PM, Crook DW, Parkhill J, Harris D, Walker S, Bowden R, Monk P, Smith EG, Peto TEA.** Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. *Lancet Infect Dis* **2013**; 13: 137-146.
- Walker TM, Kohl TA, Omar SV, Hedge J, Elias CO, Bradley P, Iqbal Z, Feuerriegel S, Niehaus KE, Wilson DJ, Clifton DA, Kapatai G, Ip CL, Boeden R, Drobniowski FA, Allix-Béguet C.** Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis* **2015** (Publicado on line).
- Warren RM, van der Spuy GD, Richardson M, Beyers N, Borgdorff MW, Behr MA, van Helden PD.** Calculation of the stability of the IS6110 banding pattern in patients with *persistent Mycobacterium tuberculosis* disease. *J Clin Microbiol* **2002**; 40: 1705-1708.

Warren RM, van Helden DP, van Pittius NCG. Insertion element IS6110-based restriction fragment length polymorphism genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Mol Biol* **2009**; 465: 353-370.

Weis SE, Pogoda JM, Yang Z, Cave MD, Wallace C, Kelley M, Barnes PF. Transmission dynamics of tuberculosis in Tarrant County, Texas. *Am J Respir Crit Care Med* **2002**; 166: 36-42.

Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harmsen D. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic Acids Res* **2010**; 38: 326-331

Wilson LG. The historical decline of tuberculosis in Europe and America: Its causes and significance. *J Hist Med Allied Sci* **1990**; 45: 366-96.

Wong P, Puray M, Gonzales A, Sevilla CR. Epidemiología molecular de la tuberculosis en el Perú. *Rev Peru Epidemiol* **2011**; 15: 6-16.

WHO. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2014. Ginebra: WHO; 2014.

Y

Yeh RW, Ponce de Leon A, Agasino CB, Hahn JA, Daley CL, Hopewell PC, Small PM. Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA genotypes. *J Infect Dis* **1998**; 177: 1107-1111.

Z

Zhang M, Gong J-H, Yang Z, Samten B, Cave MD, Barnes PF. Enhanced capacity of a widespread strain of *Mycobacterium tuberculosis* to grow in human macrophages. *J Infect Dis* **1999**; 179: 1213-1217.

Zimmerman MR. Pulmonary and osseous tuberculosis in an Egyptian mummy. *Bull NY Acad Med* **1979**; 55:604-608.

ANEXOS

Anexo 1: Encuesta epidemiológica de tuberculosis de la Comunidad Valenciana.



Conselleria de Sanitat
DIRECCIÓN GENERAL
DE SALUD PÚBLICA

La información contenida en esta encuesta es
confidencial y su uso es estrictamente sanitario
(Ley 14/1986, General de Sanidad, art. 10.3)

ENCUESTA EPIDEMIOLOGICA DE TUBERCULOSIS

DATOS DEL MÉDICO

Nombre y Apellidos: _____ Nº de Coleg: _____
Localidad: _____ Centro de Trabajo _____ Teléfono: _____
Servicio: _____ Fecha declaración _____ Semana _____
Procedencia de la declaración: _____

IDENTIFICACIÓN DEL CASO

SIP: _____ Nº Hª CLÍNICA: _____ AREA _____
Nombre: _____ Primer Apellido: _____ Segundo Apellido: _____
Fecha Nacimiento: _____ Edad: _____ (años/meses) Sexo: Hombre [] Mujer []
Domicilio: _____ D.P.: _____
Población: _____ Provincia: _____ Teléfonos: _____
Ocupación: _____ Municipio donde trabaja _____
Paciente extranjero: Sí [] Año llegada _____ Fecha llegada ___/___/___ País nacimiento _____
No []

Observaciones: _____

DATOS CLINICO-EPIDEMIOLOGICOS

Nº convivientes en el hogar: _____ Nº de personas con riesgo alto _____
Fechas: F. Inicio síntomas _____ F. Primera visita _____ F. Inicio Tto. _____ F. Diagnóstico _____
Clasificación: Confirmado [] Probable [] Error Diagnóstico [] Pendiente [] Desconocido []
Caso: Pertenece a brote [] Caso aislado [] Agregación [] Pendiente []
Desconocido [] En caso de Brote o Agregación REFERENCIA: _____
Tipo caso: Autóctono [] Importado [] Extracomunitario [] Pendiente []
Desconocido [] País _____ Com. Autónoma _____

PRUEBAS DIAGNÓSTICAS:

	Positivo	Negativo	No realizado	Pendiente	Dudoso	Desconocido
Mantoux (____mm)	[]	[]	[]	[]	[]	[]
Baciloscopia	[]	[]	[]	[]	[]	[]
Cultivo	[]	[]	[]	[]	[]	[]
Anat. Patológica	[]	[]	[]	[]	[]	[]
Rx Torax	[]	[]	[]	[]	[]	[]
Otra prueba	(_____)					

CONFIRMACIÓN BACTERIOLÓGICA: Sí [] No []

TIPO GERMEN : M. Tuberculosis [] M. Bovis [] M. Africanum [] M. Atípica []
Sin especificar [] Otro [] Desconocido []

LOCALIZACIÓN : Pulmonar [] Pleural [] Laríngea [] Meningea [] Genito-urinaria []
SNC [] Digestiva [] Diseminada [] Miliar [] Osteoarticular []
Linfática Intratorácica [] Linfática Extratorácica [] Otra localización [] Desconocido []

LOCALIZACIÓN SECUNDARIA (si la hubiera): _____

SÍNTOMAS: Respiratorios [] Generales [] Ambos [] Asintomático [] Otros []
Citar: _____

SITUACIÓN EVOLUTIVA: C.Inicial [] Tratado Previamente [] Desconocido []
Año inicio tratamiento (en el caso de Tratado Previamente) _____

Anexo 2: Modelo de plantilla que acompaña la placa para realizar electroforesis capilar en la Sección de Genómica del Servicio Central de Soporte a la investigación experimental (Universitat de València).

 <p style="font-size: small;">Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) UNIVERSITAT ID VALÈNCIA</p> <p style="color: blue; font-weight: bold;">SECCIÓN DE GENÓMICA</p>	<p>Análisis de fragmentos de ADN</p> <p>Edificio de Investigación. Dr. Moliner 50, Burjassot, 46100-Valencia Tel: 96-354 33 01 / Fax: 96-354 34 11 secuenciacion.scsie@uv.es</p>	<p>A completar por el servicio de secuenciación</p> <p>Fecha de recepción muestra:</p> <p>Fecha máxima de análisis:</p>										
<p>NOMBRE DEL USUARIO: Bárbara Gomila Sard</p>		<p>TELÉFONO: 961925969</p>										
<p>DIRECTOR DEL PROYECTO: FERNANDO GONZALEZ CANDELAS</p>		<p>E-MAIL/Usuario FTP:</p>										
<p>DEPARTAMENTO: GENÓMICA Y SALUD</p>												
<p>INSTITUTO O CENTRO: FISABIO</p>		<p>NIF:</p>										
<p>Completa la plantilla poniendo un nombre de muestra (máximo 10 caracteres) en cada celda. Caracteres no válidos: espacios \ / () < > * ' " ? Ñ ' + -</p>												
		<input checked="" type="checkbox"/> Sólo electroforesis										
		<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> FAM</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> VIC</td> <td><input type="checkbox"/> PET</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> NED</td> <td><input type="checkbox"/> HEX</td> <td><input type="checkbox"/> JOE</td> </tr> </table> <p style="font-size: x-small; text-align: center;">Indicar los fluorocromos utilizados.</p>	<input checked="" type="checkbox"/> FAM	<input checked="" type="checkbox"/> VIC	<input type="checkbox"/> PET	<input checked="" type="checkbox"/> NED	<input type="checkbox"/> HEX	<input type="checkbox"/> JOE				
<input checked="" type="checkbox"/> FAM	<input checked="" type="checkbox"/> VIC	<input type="checkbox"/> PET										
<input checked="" type="checkbox"/> NED	<input type="checkbox"/> HEX	<input type="checkbox"/> JOE										
<p>Nombre de la placa: 000_TB</p>												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												H37Ra_MIX1
B												H37Ra_MIX2
C												H37Ra_MIX3
D												H37Ra_MIX4
E												H37Ra_MIX5
F	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA
G	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA
H	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA

Anexo 3: Fragmentos esperables para cada MIRU, número de repeticiones para cada MIRU según el PM obtenido. Se ha rodeado con un círculo azul, el número de repeticiones para cada loci MIRU de la cepa patrón H37Ra. (Sg. de Beer & van Soolingen., 2012)

Method 1 (In-House)					GenoScreen					Method 1 (In-House)					GenoScreen					Method 1 (In-House)					GenoScreen				
Locus	Mix	Repeats	Size	Size	Locus	Mix	Repeats	Size	Size	Locus	Mix	Repeats	Size	Size	Locus	Mix	Repeats	Size	Size	Locus	Mix	Repeats	Size	Size					
MIRU04	1	100	110	106	MIRU10	2	0	477	470	VNTR42	3	0	536	531	VNTR47	4	0	246	246										
MIRU04	1	0	170	166	MIRU10	2	1	532	523	VNTR42	3	1	587	582	VNTR47	4	1	307	304										
MIRU04	1	101	193	189	MIRU10	2	2	585	578	VNTR42	3	2	638	633	VNTR47	4	2	363	362										
MIRU04	1	1	248	244	MIRU10	2	3	638	631	VNTR42	3	3	689	684	VNTR47	4	3	421	420										
MIRU04	1	102	272	268	MIRU10	2	4	691	684	VNTR42	3	4	740	735	VNTR47	4	4	481	478										
MIRU04	1	2	324	320	MIRU10	2	5	744	737	VNTR42	3	5	791	786	VNTR47	4	5	541	536										
MIRU04	1	103	347	343	MIRU10	2	6	795	788	VNTR42	3	6	842	837	VNTR47	4	6	598	594										
MIRU04	1	3	400	396	MIRU10	2	7	845	838	VNTR42	3	7	893	888	VNTR47	4	7	656	652										
MIRU04	1	4	476	472	MIRU10	2	8	901	894	VNTR42	3	8	944	939	VNTR47	4	8	715	710										
MIRU04	1	5	553	549	MIRU10	2	9	951	944	VNTR42	3	9	995	990	VNTR47	4	9	772	768										
MIRU04	1	6	631	627	MIRU10	2	10	999	992	VNTR42	3	10	1046	1041	VNTR47	4	10	826	826										
MIRU04	1	7	707	703	MIRU10	2	11	1052	1045	VNTR42	3	11	1097	1092	VNTR47	4	11	884	884										
MIRU04	1	8	779	775	MIRU10	2	12	1105	1098	VNTR42	3	12	1148	1143	VNTR47	4	12	941	942										
MIRU04	1	9	856	852	MIRU10	2	13	1158	1151	VNTR42	3	13	1199	1194	VNTR47	4	13	1000	1000										
MIRU04	1	10	933	929	MIRU10	2	14	1211	1204	VNTR42	3	14	1250	1245	VNTR47	4	14	1058	1058										
MIRU04	1	11	1010	1006	MIRU10	2	15	1264	1257	VNTR42	3	15	1301	1296	VNTR47	4	15	1116	1116										
MIRU04	1	12	1087	1083	MIRU16	2	0	545	536	VNTR43	3	0	171	168	VNTR52*	4	0	266	253										
MIRU04	1	13	1164	1160	MIRU16	2	1	617	608	VNTR43	3	1	207	204	VNTR52*	4	1	319	312										
MIRU04	1	14	1241	1237	MIRU16	2	2	670	661	VNTR43	3	2	261	258	VNTR52*	4	2	363	360										
MIRU04	1	15	1318	1314	MIRU16	2	3	720	711	VNTR43	3	3	314	313	VNTR52*	4	3	410	403										
MIRU26	1	0	280	273	MIRU16	2	4	772	763	VNTR43	3	4	364	361	VNTR52*	4	4	456	451										
MIRU26	1	1	335	328	MIRU16	2	5	822	813	VNTR43	3	5	418	415	VNTR52*	4	5	503	500										
MIRU26	1	2	385	378	MIRU16	2	6	872	863	VNTR43	3	6	473	470	VNTR52*	4	6	555	544										
MIRU26	1	3	437	430	MIRU16	2	7	925	916	VNTR43	3	7	526	523	VNTR52*	4	7	603	592										
MIRU26	1	4	488	481	MIRU16	2	8	978	969	VNTR43	3	8	584	581	VNTR52*	4	8	643	635										
MIRU26	1	5	539	532	MIRU16	2	9	1031	1022	VNTR43	3	9	642	639	VNTR52*	4	9	690	680										
MIRU26	1	6	592	585	MIRU16	2	10	1084	1075	VNTR43	3	10	700	697	VNTR52*	4	10	736	725										
MIRU26	1	7	641	634	MIRU16	2	11	1137	1128	VNTR43	3	11	758	755	VNTR52*	4	11	785	770										
MIRU26	1	8	692	685	MIRU16	2	12	1190	1181	VNTR43	3	12	816	813	VNTR52*	4	12	825	815										
MIRU26	1	9	743	736	MIRU16	2	13	1243	1234	VNTR43	3	13	874	871	VNTR52*	4	13	870	860										
MIRU26	1	10	794	787	MIRU31	2	0	492	481	ETR-A	3	0	195	191	VNTR52*	4	14	915	905										
MIRU26	1	11	845	838	MIRU31	2	1	543	532	ETR-A	3	1	270	266	VNTR52*	4	15	956	946										
MIRU26	1	12	892	885	MIRU31	2	2	596	585	ETR-A	3	2	345	341	VNTR53	4	0	558	463										
MIRU26	1	13	943	936	MIRU31	2	3	650	639	ETR-A	3	3	420	416	VNTR53	4	1	618	525										
MIRU40	1	0	347	342	MIRU31	2	4	702	691	ETR-A	3	4	498	494	VNTR53	4	2	673	583										
MIRU40	1	1	401	396	MIRU31	2	5	751	740	ETR-A	3	5	575	571	VNTR53	4	3	732	642										
MIRU40	1	2	455	450	MIRU31	2	6	804	793	ETR-A	3	6	652	648	VNTR53	4	4	790	701										
MIRU40	1	3	509	504	MIRU31	2	7	853	842	ETR-A	3	7	731	727	VNTR53	4	5	850	760										
MIRU40	1	4	563	558	MIRU31	2	8	903	892	ETR-A	3	8	808	804	VNTR53	4	6	910	809										
MIRU40	1	5	617	612	MIRU31	2	9	953	942	ETR-A	3	9	888	884	VNTR53	4	7	971	860										
MIRU40	1	6	671	666	MIRU31	2	10	1003	992	ETR-A	3	10	970	966	VNTR53	4	8	1030	907										
MIRU40	1	7	725	720	MIRU31	2	11	1059	1048	ETR-A	3	11	1038	1034	VNTR53	4	9	1090	952										
MIRU40	1	8	779	774	MIRU31	2	12	1112	1101	ETR-A	3	12	1109	1105	VNTR53	4	10	1150	1001										
MIRU40	1	9	833	828	MIRU31	2	13	1165	1154	ETR-A	3	13	1186	1182	VNTR53	4	11	1210	1060										
MIRU40	1	10	887	882	MIRU31	2	14	1218	1207	ETR-A	3	14	1263	1259	VNTR53	4	12	1271	1119										
MIRU40	1	11	941	936	MIRU31	2	15	1271	1260	ETR-A	3	15	1340	1336	VNTR53	4	13	1331	1178										
MIRU40	1	12	995	990											VNTR53	4	14	1390	1237										
MIRU40	1	13	1049	1045											VNTR53	4	15	1450	1296										
MIRU40	1	14	1103	1098																									
MIRU40	1	15	1157	1152																									

Locus	Mix	Repeats	Size	Size
				Method 1 (In-House)
				GenoScreen
QUB-11b	5	0	64	66
QUB-11b	5	1	135	137
QUB-11b	5	2	204	206
QUB-11b	5	3	276	278
QUB-11b	5	4	346	348
QUB-11b	5	5	417	419
QUB-11b	5	6	489	491
QUB-11b	5	7	560	562
QUB-11b	5	8	631	633
QUB-11b	5	9	702	704
QUB-11b	5	10	773	775
QUB-11b	5	11	844	846
QUB-11b	5	12	915	917
QUB-11b	5	13	986	988
QUB-11b	5	14	1057	1059
QUB-11b	5	15	1128	1130
1955	5	0	92	92
1955	5	1	149	149
1955	5	2	203	203
1955	5	3	256	256
1955	5	4	309	309
1955	5	5	363	363
1955	5	6	417	417
1955	5	7	472	472
1955	5	8	528	528
1955	5	9	583	583
1955	5	10	638	638
1955	5	11	692	692
1955	5	12	745	745
1955	5	13	799	799
QUB 26	5	0	187	175
QUB 26	5	1	278	266
QUB 26	5	2	379	367
QUB 26	5	3	490	478
QUB 26	5	4	602	590
QUB 26	5	5	712	700
QUB 26	5	6	823	811
QUB 26	5	7	934	922
QUB 26	5	8	1025	1013
QUB 26	5	9	1139	1127
QUB 26	5	10	1250	1238
QUB 26	5	11	1361	1349
QUB 26	5	12	1472	1460
QUB 26	5	13	1583	1571
QUB 26	5	14	1694	1682
QUB 26	5	15	1805	1793

