

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

Optimización metodológica para detección de complejidad clonal en la infección por "Mycobacterium tuberculosis" y caracterización de cepas de especial interés clínico y epidemiológico

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Ana María Martín Sánchez

DIRECTOR:

Darío, dir García de Viedma

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5327641059

T616.24-002.5
MAR
opt

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



OPTIMIZACION METODOLOGICA PARA LA DETECCION DE COMPLEJIDAD CLONAL EN LA INFECCION POR *Mycobacterium tuberculosis* Y CARACTERIZACION DE CEPAS DE ESPECIAL INTERES CLINICO Y EPIDEMIOLOGICO

Tesis doctoral presentada por

Ana María Martín Sánchez

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA III

FACULTAD DE BIOLOGIA

Trabajo realizado en el Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas
del Hospital General Universitario Gregorio Marañón,
bajo la dirección del Dr. Darío García de Viedma.



Madrid, 2010

R1395464 21

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



Darío García de Viedma, Doctor en Ciencias Biológicas y adjunto especialista del Departamento de Microbiología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Optimización metodológica para la detección de complejidad clonal en la infección por *Mycobacterium tuberculosis* y caracterización de cepas de especial interés clínico y epidemiológico” realizada por Ana María Martín Sánchez para optar al grado de Doctora, ha sido elaborada bajo mi dirección y cumple los requisitos necesarios para su tramitación y posterior defensa ante el tribunal correspondiente.

Para que conste a efectos oportunos, firmo la presente a petición del interesado

Madrid, 30 de Abril de 2009.

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and strokes, representing the name Darío García de Viedma.

Dr. Darío García de Viedma

A lo largo de estos casi cinco años que han pasado desde el inicio de esta tesis doctoral, son muchas las personas que, en mayor o menor medida, han contribuido a la realización de este trabajo y a las que me gustaría expresarles mi más profundo agradecimiento.

En primer lugar, dar las gracias a todos y cada uno de los miembros del Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas del Hospital Gregorio Marañón y, en especial, al Dr. Emilio Bouza por brindarme la oportunidad de comenzar con ellos mi carrera científica y por el apoyo prestado siempre que ha sido necesario.

Al Dr. Darío García de Viedma, mi director de tesis, por tantas horas de dedicación, tantos consejos y tanta confianza depositada en mí. Gracias por contribuir no sólo a mi evolución profesional, sino también a mi desarrollo como persona. Durante este tiempo he descubierto que, a pesar de ser un duro camino, la investigación aporta muchas satisfacciones y despierta grandes inquietudes.

Quiero dar las gracias también a todas las personas que han ido pasando por el laboratorio a lo largo de estos años y que me han ofrecido su ayuda siempre que ha sido necesario y con las que he compartido incontables horas de trabajo, así como buenos momentos. Gracias a: Noelia, todas "las Sandras", Cristina, M^a Angeles, Pilar, Jesús, Juan, etc.

En especial gracias a Marta, María y Paula; empezasteis como compañeras, pero me llevo tres grandes y buenas amigas. Sin vosotras, el camino recorrido durante este tiempo no hubiese sido tan llevadero. Mil gracias por vuestra ayuda, vuestros consejos y la infinidad de ratos buenos que hemos vivido juntas. También porque, entre todas, hemos sabido ponerle una sonrisa a los malos momentos.

Tampoco podría olvidarme de todas aquellas personas que directamente han colaborado en la realización de esta tesis doctoral:

- *Gracias al grupo de estudio de la tuberculosis de Almería y, en especial, a Miguel Martínez Lirola.*
- *Gracias al Dr. Fernando Chaves y al Dr. Jesús Iñigo del Hospital Doce de Octubre.*

- *Gracias al Dr. Graham Stewart de la Universidad de Guildford*
- *Gracias al Dr. Roberto Solano y a la Dra. Gloria García del Centro Nacional de Biotecnología.*

Por último y de una manera muy especial, me gustaría dar las gracias a las personas que, por encima de todo, han estado apoyándome día a día durante estos casi cinco años; sin ellos, nada de esto hubiese sido posible. Gracias de todo corazón a mis padres, mi hermano, mis abuelos y Alejandro, por estar siempre ahí, incluso cuando yo no he dejado que estuvieseis. A vosotros va dedicada esta tesis.

INDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCION	1
1. SITUACION ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS	5
1.1. La carga mundial de tuberculosis	5
1.2. La tuberculosis en Europa	7
1.3. La tuberculosis en España	9
1.4. Tuberculosis y VIH	10
2. ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DE LA TUBERCULOSIS	12
2.1. Medidas de control global	12
2.1.1. Estrategia DOTS	12
2.1.2. Estrategia Alto a la tuberculosis	14
2.2. Medidas de control local	16
Estudio convencional de contactos	16
3. AGENTE ETIOLOGICO DE LA TUBERCULOSIS	18
4. DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD	20
4.1. Diagnóstico microbiológico	20
4.1.1. Examen microscópico	20
4.1.2. Cultivo	22
4.2. Diagnóstico molecular	23
Detección directa de <i>M. tuberculosis</i> en la muestra clínica	24
4.3. Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos	24
4.3.1. Métodos fenotípicos convencionales para la detección de resistencias	24
4.3.2. Métodos genotípicos para la detección de resistencia a fármacos de primera línea	26
4.4. Diagnóstico de la infección latente por <i>M. tuberculosis</i>	28
4.4.1. Prueba de la tuberculina	28
4.4.2. Métodos alternativos a la prueba de la tuberculina	29
5. MANIFESTACIONES CLINICAS, TRANSMISION Y TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS	31
5.1. Manifestaciones clínicas de la tuberculosis	31
5.2. Transmisión y desarrollo de la tuberculosis	33

5.3. Tratamiento de la tuberculosis	35
5.4. Vacunas contra la tuberculosis	36
6. EPIDEMIOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS	38
Incremento de la tuberculosis y análisis de los factores implicados	38
6.1. Brotes de tuberculosis	38
6.2. Tuberculosis e inmigración	40
6.3. Cepas prevalentes y factores de riesgo asociados a su transmisión	41
7. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE LA TUBERCULOSIS	43
7.1. Principales técnicas de genotipado de <i>M. tuberculosis</i>	44
7.1.1. IS6110-RFLP	44
7.1.2. Spoligotipado	46
7.1.3. MIRU-VNTR	47
7.2. Aplicaciones de las técnicas de genotipado de <i>M. tuberculosis</i>	49
7.2.1. Epidemiología molecular. Estudio de las dinámicas de transmisión de <i>M. tuberculosis</i>	49
7.2.2. Caracterización de recurrencias	49
7.2.3. Análisis de la complejidad clonal en la infección por <i>M. tuberculosis</i>	50
7.2.4. Análisis de la distribución geográfica de cepas de <i>M. tuberculosis</i>	51
7.2.5. Evaluación de los programas de control de la tuberculosis	52
7.2.6. Detección de contaminaciones cruzadas de laboratorio	54
8. PATOGENESIS, VIRULENCIA E INMUNIDAD	55
8.1. Fagocitosis e inhibición de la maduración del fagosoma	55
8.2. Factores de virulencia de <i>M. tuberculosis</i>	57
8.3. Interacción con el sistema inmune	58
8.4. Medida de la virulencia de <i>M. tuberculosis</i>	60
8.5. Infección latente por <i>M. tuberculosis</i>	61
8.6. Análisis de la expresión génica durante la infección por <i>M. tuberculosis</i>	62
8.6.1. Microarrays	62
8.6.2. Genómica comparativa	63
8.6.3. Genómica funcional	64

OBJETIVOS GENERALES	67
Líneas generales de trabajo	71
Objetivos	73
METODOLOGIA Y RESULTADOS	75
1. Resolución molecular optimizada de las alertas de contaminación cruzada en los laboratorios de micobacteriología clínica	81
2. Reanálisis de casos de tuberculosis relacionados epidemiológicamente no confirmados por el genotipado basado en la técnica IS6110-RFLP	91
3. Análisis clonal rápido de casos de tuberculosis recurrente mediante análisis por MIRU-VNTR directamente sobre aislados clínicos archivados	103
4. La composición clonal de <i>M. tuberculosis</i> presente en las muestras clínicas puede verse modificada tras su cultivo	113
5. Reinfeción exógena por <i>M. tuberculosis</i> : posible asignación errónea dedida a infecciones policlonales y análisis del posible papel de factores bacterianos	147
6. Caracterización molecular, epidemiológica e infectiva de una cepa de <i>M. tuberculosis</i> prevalente en Madrid	175
7. Caracterización genómica y transcriptómica de dos variantes clonales de <i>M. tuberculosis</i> con comportamientos infectivos diferentes	183
8. Análisis de la virulencia de una selección de cepas pertenecientes a la familia W-Beijing y estudio del perfil transcriptómico celular generado tras la infección	189
DISCUSION	211
1. Epidemiología molecular: identificación de entornos de análisis con limitaciones y desarrollo de nuevas aproximaciones metodológicas orientadas a solventarlas	217
1.1. Refinamiento metodológico para la identificación de contaminaciones cruzadas de laboratorio	218
1.2. Análisis refinado de microepidemias no confirmadas por las técnicas de genotipado	219

2. Optimización para la detección de complejidad clonal y análisis de su implicación clínica y epidemiológica	221
2.1. Análisis clonal rápido de casos de tuberculosis recurrente	222
2.2. Efecto del cultivo de las muestras clínicas sobre la complejidad clonal de las mismas	223
2.3. Impacto de la complejidad clonal en el análisis de la infección por <i>M. tuberculosis</i>	225
3. Análisis de la infectividad de cepas de <i>M. tuberculosis</i> con interés clínico y/o epidemiológico	227
3.1. Caracterización de la infectividad de aislados pertenecientes a la familia W-Beijing	228
3.2. Caracterización de la infectividad de una cepa de <i>M. tuberculosis</i> prevalente en Madrid	230
3.3. Caracterización de la infectividad de cepas implicadas en reinfecciones exógenas	231
4. Factores genéticos implicados en la infectividad de <i>M. tuberculosis</i>	232
4.1. Caracterización genómica y transcriptómica de dos variantes clonales de <i>M. tuberculosis</i> con infectividad diferencial	232
4.2. Caracterización del perfil transcriptómico celular generado tras la infección con una selección de cepas W-Beijing	233
4.2.1 Análisis de patrones de expresión comunes en la infección por <i>M. tuberculosis</i>	235
4.2.2. Análisis de patrones de expresión específicos en la infección por cepas de <i>M. tuberculosis</i> pertenecientes a la familia W-Beijing	236
4.2.3. Análisis de patrones de expresión singulares de cepa en la infección por <i>M. tuberculosis</i>	237
4.2.4. Limitaciones existentes en el análisis de la expresión génica	240
CONCLUSIONES	243
BIBLIOGRAFIA	249
ANEXOS	273

Anexo 1 Perfil transcriptómico celular común a todas las cepas de <i>M. tuberculosis</i>	277
Anexo 2: Perfil transcriptómico celular común a la infección por las cepas Beijing	295
Anexo 3: Perfil transcriptómico celular común a la infección por las cepas Beijing de mayor infectividad	299
Anexo 4: Perfil transcriptómico celular específico de la cepa 4	303
Anexo 5: Perfil transcriptómico celular específico de la cepa 7	311
Anexo 6: Perfil transcriptómico celular específico de la cepa 5	319

ABREVIATURAS

AAR	_____	Acido-alcohol resistente
ADN	_____	Acido desoxirribonucleico
ADNc	_____	Acido desoxirribonucleico complementario
ARN	_____	Acido ribonucleico
ARNm	_____	Acido ribonucleico mensajero
ARNr	_____	Acido ribonucleico ribosómico
BCG	_____	Bacilo de Calmette-Guérin
CDC	_____	Center for Disease Control
CMI	_____	Concentración mínima inhibitoria
dCTP	_____	desoxicitidina trifosfato
DOTS	_____	Directly Observed Treatment Short course
DO	_____	Densidad óptica
ELISA	_____	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ESAT-6	_____	The 6 kDa early secretory antigenic target
G+C	_____	Guanina + Citosina
IFN-γ	_____	Interferón gamma
IFNβ2	_____	Interferón beta 2
Ig G	_____	Inmunoglobulina G
IL	_____	Interleuquina
IS6110	_____	Secuencia de inserción 6110
kDa	_____	Kilodalton
LAM	_____	Lipoarabinomanano
LSP	_____	Polimorfismo de secuencia larga
MAP3K8	_____	Proteín quinasa activada por mitógeno 8
MGIT	_____	Tubo indicador de crecimiento de micobacterias
MIRU	_____	Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit
MMP	_____	Metalopeptidasa de matriz extracelular
MSR1	_____	Receptor scavenger 1 de macrófagos
OADC	_____	Oleico albúmina dextrosa catalasa
OMS	_____	Organización mundial de la salud
PAS	_____	Acido para-aminosalicílico
pb	_____	Pares de bases
PCR	_____	Reacción en cadena de la polimerasa

PGL _____ Fenolglucolípido
RC3 _____ Receptor del complemento 3
RD _____ Repetición directa
RFLP _____ Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción
rpm _____ Revoluciones por minuto
SIDA _____ Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNP _____ Polimorfismo de secuencia única
TLR4 _____ Receptor toll like 4
TNF- α _____ Factor de necrosis tumoral alfa
VIH _____ Virus de la inmunodeficiencia humana
VNTR _____ Repeticiones en tándem de número variable

INTRODUCCIÓN

1. SITUACION ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS

“Actualmente la tuberculosis ocupa el séptimo lugar en el ranking global de causas de muerte”

“Cada segundo, en alguna parte del mundo, alguien se infecta de nuevo con el bacilo de la tuberculosis”

“Un tercio de la población mundial está infectada por *Mycobacterium tuberculosis*, de los cuales el 5-10% llegarán a desarrollar la enfermedad en algún momento de su vida.”

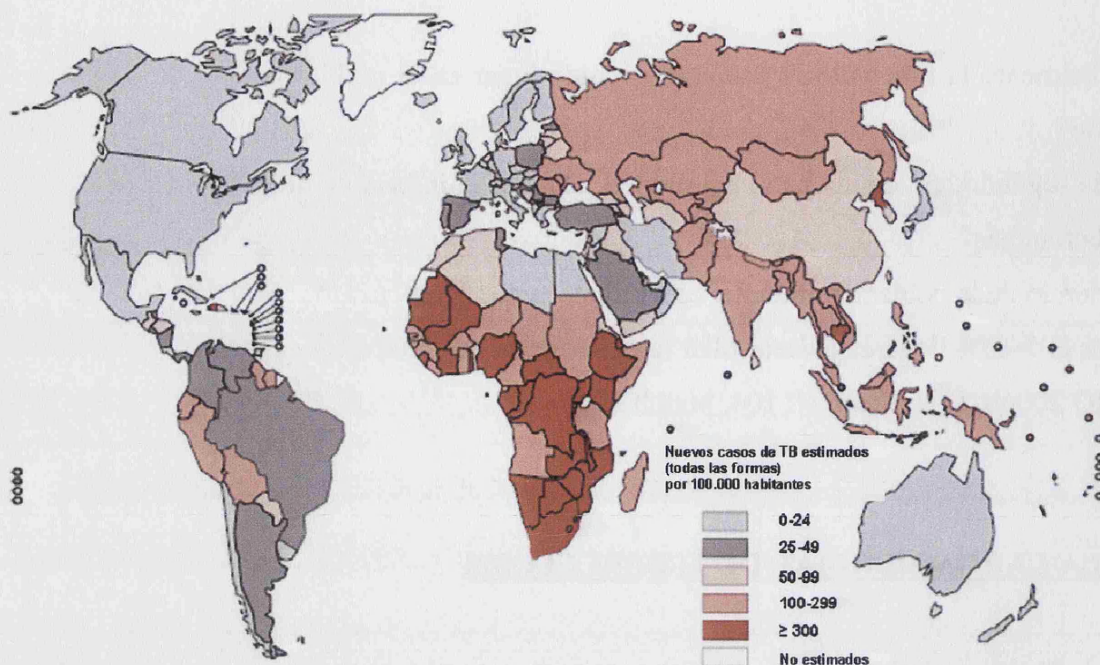
(WHO 2006b, Fact Sheet, N° 104, March 2006)

1.1. LA CARGA MUNDIAL DE TUBERCULOSIS

El último informe de la OMS ha estimado que el número de casos incidentes de tuberculosis en todo el mundo es de 9,27 millones para el año 2007 (139 casos por 100.000 habitantes), de los cuales 4,1 millones (61 casos por 100.000 habitantes) fueron nuevos casos bacilíferos (44% del total) y 1,37 millones (14.8% del total) fueron VIH-positivos. En este mismo año, se registraron 1,3 millones de muertes entre los casos incidentes de tuberculosis VIH-negativos y 456.000 entre los casos VIH-positivos (247).

La mayoría de casos se registraron en Asia (55%) y Africa (31%), mientras que en las regiones del Mediterráneo Oriental, Europa y América las cifras correspondientes fueron 6%, 5% y 3%, respectivamente. India, China, Indonesia, Nigeria y Sudáfrica ocupan, por este orden, los cinco primeros puestos en cifras absolutas de casos de tuberculosis. Africa posee la mayor tasa de incidencia (363 por 100 000 habitantes) (Figura 1) y los mayores porcentajes de casos de tuberculosis entre la población VIH-positiva correspondieron a Africa (79%) y Asia Sudoriental (11%) (247).

Figura 1. Tasas de incidencia de tuberculosis estimadas por países, 2007 (247)



A pesar de que el número absoluto de casos incidentes de tuberculosis está aumentando debido al crecimiento de la población, la tasa de incidencia está disminuyendo, aunque a ritmo lento (menos del 1% al año). La incidencia mundial de tuberculosis alcanzó su valor máximo en 2004, con 142 casos por cada 100.000 habitantes, mientras que en 2007 la estimación fue de 139 casos por 100.000 habitantes. Dicha incidencia está disminuyendo en cinco de las seis regiones de la OMS; la excepción es la región de Europa, donde se mantiene relativamente estable (247). Existen 22 países con una carga elevada de tuberculosis que agrupan al 80% de los casos de tuberculosis que se producen anualmente en todo el mundo, la mayoría de los cuales pertenecen a la región de África (Tabla 1).

En cuanto a la tuberculosis multirresistente, en 2007 se detectaron 0.5 millones de casos, el 85% de los cuales se registraron en 27 países (15 de ellos pertenecientes a Europa). Los cinco países con mayor número de casos de tuberculosis multirresistente fueron India (131.000), China (112.000), la Federación Rusa (43.000), Sudáfrica (16.000) y Bangladesh (15.000). En cuanto a la tuberculosis extremadamente resistente, que es aquella que presenta resistencia a isoniazida y rifampicina y a fármacos de segunda línea que incluyen, al menos, una fluoroquinolona y uno de los tres fármacos

inyectables (amikacina, kanamicina o capreomicina), 55 países habían notificado al menos un caso a finales de 2008 (247).

Tabla 1. Incidencia de tuberculosis en los 22 países que poseen la carga más elevada de enfermedad, 2007 (247)

	HABITANTES 1000S	INCIDENCIA			
		TODAS LAS FORMAS		BACILOSCOPIA POSITIVA	
		CASOS 1000S	POR 100.000 HAB POR AÑO	CASOS 1000S	POR 100.000 HAB POR AÑO
1 India	1 169 016	1 962	168	873	75
2 China	1 328 630	1 306	98	585	44
3 Indonesia	231 627	528	228	236	102
4 Nigeria	148 093	460	311	195	131
5 South Africa	48 577	461	948	174	358
6 Bangladesh	158 665	353	223	159	100
7 Ethiopia	83 099	314	378	135	163
8 Pakistan	163 902	297	181	133	81
9 Philippines	87 960	255	290	115	130
10 DR Congo	62 636	245	392	109	174
11 Russian Federation	142 499	157	110	68	48
12 Viet Nam	87 375	150	171	66	76
13 Kenya	37 538	132	353	53	142
14 Brazil	191 791	92	48	49	26
15 UR Tanzania	40 454	120	297	49	120
16 Uganda	30 884	102	330	42	136
17 Zimbabwe	13 349	104	782	40	298
18 Thailand	63 884	91	142	39	62
19 Mozambique	21 397	92	431	37	174
20 Myanmar	48 798	83	171	37	75
21 Cambodia	14 444	72	495	32	219
22 Afghanistan	27 145	46	168	21	76

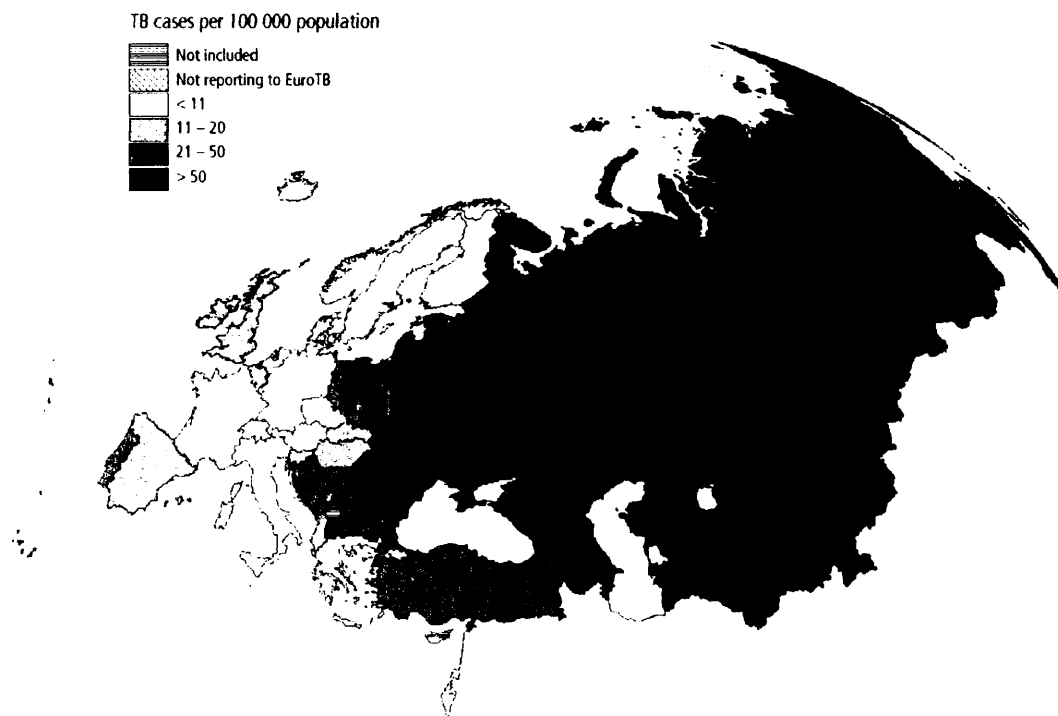
1.2. LA TUBERCULOSIS EN EUROPA

Según los últimos datos de la OMS, en 2006 se notificaron 422.830 casos de tuberculosis en 51 de los 53 países que componen la región Europea de la OMS, lo que supone el 7% de los casos de tuberculosis notificados en todo el mundo. El 73% de los

casos pertenecía a la región Este de Europa, el 21% a la Unión Europea y Oeste de Europa y el 6% a los países restantes de la zona de los Balcanes (246).

La incidencia de tuberculosis es muy variable en los distintos países de Europa, con tasas que varían desde 5 casos de tuberculosis por 100.000 habitantes en Noruega hasta 198 por 100.000 habitantes en Tajikistan. La federación Rusa ocupa el puesto número 12 en la lista global de los 22 países con la incidencia más elevada de tuberculosis (http://www.euro.who.int/document/TUB/fs02e_tbepidemeuro.pdf) (Figura 2).

Figura 2. Tasas de incidencia de tuberculosis en la Región Europea de la OMS (2006) (111)



El porcentaje más elevado de casos de tuberculosis coinfectados con VIH fue registrado en Islandia y Portugal, con un 19% y 12% de casos respectivamente. Estonia y Letonia han experimentado un aumento acusado en el porcentaje de casos de tuberculosis coinfectados con VIH en los últimos años, pasando de un 0.1% a un 9% en el caso de Estonia y de un 0.7% a un 3.4% en el caso de Letonia (111).

En toda Europa se han notificado un total de 70.000 casos de tuberculosis multirresistente, de los cuales el 95% pertenecen a Europa del Este, lo que representa un

15% del total de casos de tuberculosis que tienen lugar en esa zona, alcanzando en algunos países los porcentajes de multirresistencia más elevados del mundo, como es el caso de Azerbaiyán o la República de Moldavia, donde un 20% de los casos de tuberculosis son multirresistentes. Además, en Estonia y Armenia el 27.3% y el 4% de los casos de tuberculosis multirresistente fueron casos de tuberculosis extremadamente resistente (241).

La crisis económica y los debilitados sistemas de salud pública existentes en los países de Europa del Este son las causas principales del resurgimiento de la tuberculosis en esta región. En Europa Occidental, la existencia de focos de marginalización social e inmigrantes procedentes de zonas donde la incidencia de tuberculosis es elevada, son las causas principales del incremento de la enfermedad, especialmente en las grandes ciudades como Londres, París, Barcelona, Madrid y Milán.

(http://www.euro.who.int/document/TUB/fs02e_tbepidemeuro.pdf)

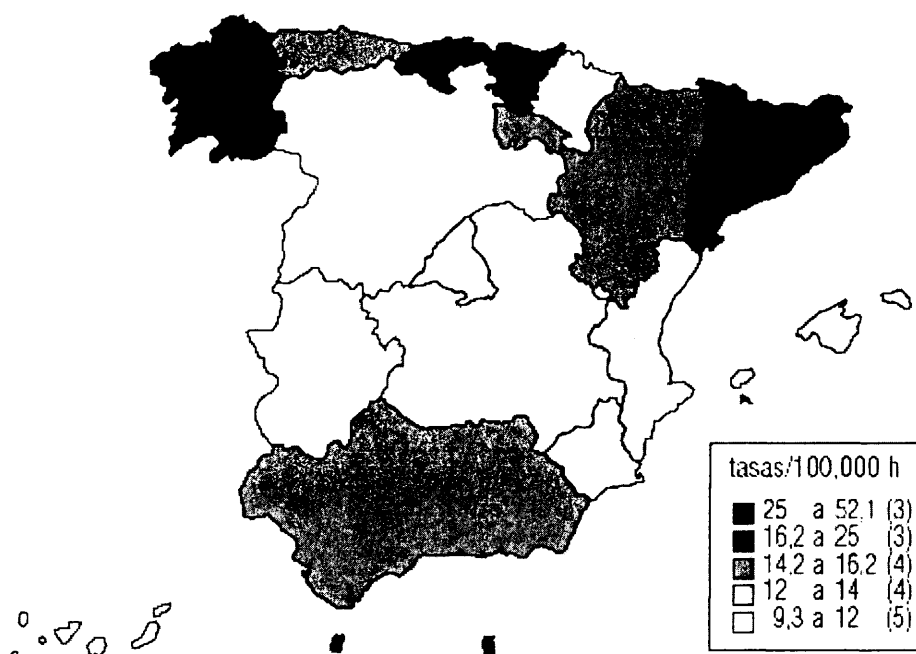
1.3. LA TUBERCULOSIS EN ESPAÑA

Según el último informe del Centro Nacional de Epidemiología, el número total de casos de tuberculosis respiratoria notificados en 2008 fue de 6.619, con una tasa de 14.81 casos por 100.000 habitantes (2). Sin embargo, se estima que una tercera parte de los casos no son notificados, a pesar de tratarse de una enfermedad de declaración obligatoria, por lo que se considera que estas cifras infravaloran la situación real. En el último informe de la OMS, se ha estimado que la incidencia de tuberculosis en España fue de 30 casos por 100.000 habitantes en el año 2008 (247).

En relación al número de casos absolutos de tuberculosis notificados por Comunidades Autónomas, Cataluña encabeza la lista con un total de 1.422 casos, seguida de Andalucía (922) y Madrid (857). Las Comunidades con el menor número de casos notificados fueron Ceuta y Melilla, con un total de 34 y 14 casos de tuberculosis respectivamente. Sin embargo, atendiendo a las tasas de tuberculosis notificadas por 100.000 habitantes, Ceuta (48.70), Galicia (22.52) y Melilla (20.77) se sitúan en los primeros lugares, mientras que Canarias (8.04) y Extremadura (9.66) ocupan los últimos puestos (2) (Figura 3).

A pesar de la tendencia decreciente que se registró en España en el número de casos de tuberculosis a partir de 1995, debido al aumento de las medidas de control en la población VIH-positiva, con la entrada del nuevo milenio se produjo una desaceleración en dicha tendencia. En 2003 un 33.7% de los casos de tuberculosis se registraron en la población inmigrante, en comparación con el 5.2% observado en 1998. Al igual que en el resto de países industrializados, la principal causa de esta desaceleración está asociada con el incremento en la llegada de inmigrantes procedentes de países donde la incidencia de tuberculosis es elevada (117). En cuanto a las tasas de resistencia registradas en 2006, un 10% de los casos presentaban resistencia a isoniazida, un 4.4% a rifampicina y un 3.8% eran casos de tuberculosis multirresistente (111).

Figura 3. Tasas de incidencia de tuberculosis por Comunidades Autónomas (2005-2006) (2).



Fuente: Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Elaboración: Centro Nacional de Epidemiología.

1.4. TUBERCULOSIS Y VIH

La infección por el VIH es un importante factor de riesgo asociado a la tuberculosis. No sólo aumenta el riesgo de reactivación de una infección latente por *M.*

tuberculosis, sino que también incrementa el riesgo de desarrollar una tuberculosis tras una infección reciente y el riesgo de reinfección con una nueva cepa (52). La carga de tuberculosis ha aumentado a un ritmo muy rápido en la última década en aquellos países que presentan una epidemia por el VIH/SIDA, especialmente en las regiones del Sur de Africa. Además, la tuberculosis es la principal causa de muerte entre los individuos adultos VIH-positivos de los países subdesarrollados (6, 52, 244).

En el año 2000, el 9% del total de nuevos casos de tuberculosis en adultos (15-49 años) presentaban coinfección por VIH. Este porcentaje fue mucho más elevado en Africa (31%) y en algunos países industrializados, como Estados Unidos (26%). En este mismo año, el número de muertes por tuberculosis fue de 1,8 millones, de las cuales el 12% se detectaron en pacientes coinfectados por VIH (52). No obstante, las cifras de casos incidentes y mortalidad por tuberculosis coinfectados por VIH alcanzaron su valor máximo en 2005 (15% de todos los casos incidentes y 480.000 muertes) (247). Actualmente, los datos disponibles en 2008 son mediciones directas de la proporción de casos coinfectados con *M. tuberculosis* y VIH en 64 países. Estos datos indican que, en países con epidemia de VIH, en comparación con los pacientes VIH-negativos, los pacientes VIH-positivos tienen una probabilidad veinte veces mayor de contraer tuberculosis. En países donde la prevalencia de VIH es menor, la probabilidad de contraer tuberculosis para los pacientes VIH-positivos es entre 26 y 37 veces mayor (247).

Recientemente, la OMS ha creado el Grupo de Trabajo tuberculosis/VIH (www.stoptb.org/wg/tb_hiv) para actuar de manera conjunta a la hora de combatir la combinación letal que forman la tuberculosis y el VIH. En este sentido, existen políticas de colaboración entre los programas de control de ambas enfermedades para reducir la carga de tuberculosis entre los pacientes VIH-positivos y, asimismo, reducir la carga de VIH entre los pacientes con tuberculosis. Estas actividades han de ser incluidas en los programas nacionales de control de la tuberculosis (6, 242, 243, 248).

2. ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DE LA TUBERCULOSIS

2.1. MEDIDAS DE CONTROL GLOBAL DE LA TUBERCULOSIS

2.1.1. ESTRATEGIA DOTS

En 1994 se creó la estrategia de control de la tuberculosis recomendada internacionalmente, que más tarde se denominaría DOTS (Directly Observed Treatment, Short-course), que consta de cinco puntos fundamentales:

(<http://www.who.int/tb/dots/en/index>)

- 1) Compromiso político mediante incremento de la financiación: se considera que los recursos económicos actuales son insuficientes y es necesario un compromiso político que soporte todos los cambios estructurales y financieros necesarios para mejorar la disponibilidad, distribución y motivación de trabajadores sanitarios competentes.
- 2) Detección de casos mediante pruebas bacteriológicas de calidad garantizada: las pruebas bacteriológicas continúan siendo el método recomendado para la detección de la tuberculosis. Para asegurar un buen diagnóstico bacteriológico, se establece la necesidad de organizar una red de laboratorios correctamente equipados y con personal entrenado. Además, se propone que cada país debe instaurar un laboratorio nacional de referencia completamente equipado.
- 3) Tratamiento estandarizado con supervisión y apoyo al paciente: deben aplicarse tratamientos efectivos, regímenes cortos y una dosis diaria fija y única para facilitar la adherencia y reducir el riesgo de desarrollo de resistencias. Los servicios de control de la tuberculosis deben identificar aquellos factores que pueden provocar que un paciente interrumpa su tratamiento. El tratamiento supervisado, que puede incluir la terapia directamente observada (TDO), asegura la adherencia y ayuda a los pacientes a tomar su medicación y a completar el tratamiento.
- 4) Sistema eficaz de suministro y gestión de los medicamentos: un suministro ininterrumpido de los fármacos antituberculosos a todos los centros sanitarios es necesario para el control de la tuberculosis. Dichos fármacos han de estar disponibles

de manera gratuita para todos los pacientes con tuberculosis y el uso que los proveedores hacen de estos fármacos ha de monitorizarse de manera estricta.

- 5) Sistema de monitorización y evaluación, y medida del impacto: es necesario establecer un sistema de comunicación regular entre los niveles centrales y periféricos del Sistema de Salud. Este sistema requiere la recogida de información de cada paciente, incluyendo la información referente al tratamiento. Estos datos serán posteriormente analizados para identificar los problemas que sea necesario solventar, tanto a nivel local como nacional, con el fin de mejorar el sistema de control de la tuberculosis.

En el momento de su creación, el objetivo de la estrategia DOTS era poder alcanzar el diagnóstico del 70% de los casos de tuberculosis y lograr una tasa de curación del 85% en 2005 (193). En 2006 el DOTS había sido implementado ya en 184 países, los cuales albergan el 99% de los casos de tuberculosis y el 93% de la población mundial. Este mismo año fueron notificados un total de 4,9 millones de nuevos casos de tuberculosis (98% del total de nuevos casos notificados en todo el mundo), entre ellos 2,5 millones de nuevos casos bacilíferos (99% del total). Entre 1995 y 2006 los programas DOTS notificaron un total de 31,8 millones de nuevos casos y recaídas y 15,5 millones de nuevos casos bacilíferos (246).

La tasa de éxito en el tratamiento bajo la supervisión del DOTS aumentó de un 77% a un 80% entre los años 1994 y 1998 y ha permanecido estable desde entonces. Sin embargo, estas cifras varían de unas regiones a otras, ya que mientras que en la región de la OMS del Pacífico Oeste los resultados han sido muy satisfactorios (principalmente resultado del 93% de éxito en el tratamiento alcanzado en China), en otras regiones, como África o Europa del Este, las cifras son desesperanzadoras (166, 193). Aunque no hay datos rigurosos que apoyen la eficacia del DOTS, esta estrategia ha ayudado a fortalecer el sistema de salud pública y, en los países más pobres, ha contribuido a construir su infraestructura básica (193).

El incremento en el número de casos de tuberculosis multirresistente y la dificultad que supone el tratamiento de los mismos, debido a que los fármacos empleados en estos casos son menos efectivos, hizo necesario que, como suplemento de la estrategia DOTS, se crease la estrategia DOTS-plus. Esta estrategia consta de los cinco puntos principales de la estrategia DOTS y, además, tiene en cuenta problemas específicos que

han de ser solventados en regiones con una elevada prevalencia de tuberculosis multirresistente. La estrategia DOTS-plus ha de seguir las recomendaciones establecidas por la OMS para disminuir el riesgo de adquisición de resistencias a antituberculosos de segunda línea. El régimen de tratamiento recomendado por la OMS incluye la administración de dos o más fármacos antituberculosos de segunda línea a los cuales el aislado es sensible, incluyendo un fármaco administrado por vía parenteral durante al menos seis meses. El tratamiento debe ser directamente observado e individualizado para cada paciente según el perfil de sensibilidad del aislado de *M. tuberculosis* y ha de tener una duración de 18 a 24 meses (166).

DOTS-plus no pretende ser una estrategia de aplicación global, sino que debe ser implementada únicamente en aquellas regiones donde existan niveles moderados o elevados de multirresistencia. Actualmente la estrategia DOTS-plus se ha implementado en Bolivia, Costa Rica, Estonia, Haití, Uzbekistán, Letonia, Malawi, México, Perú, Filipinas y la Federación Rusa. Recientemente, la estrategia DOTS-Plus se ha aprobado en Georgia, Honduras, Jordán, Kenia, Kirgizstan, Líbano, Nepal, Nicaragua, Rumania and Siria (105, 193, 249).

2.1.2. ESTRATEGIA ALTO A LA TUBERCULOSIS

La tuberculosis es una de las prioridades definidas dentro del marco de los Objetivos de Desarrollo del Milenio (ODM) de las Naciones Unidas. La meta 6: C incluida en los ODM consiste en haber detenido y comenzado a reducir la incidencia de la tuberculosis para el año 2015. Este objetivo incluye la monitorización de la tasa de prevalencia y mortalidad asociada a la tuberculosis y de la proporción de casos detectados y curados por el DOTS (78).

En 2006 la OMS creó la Estrategia Alto a la tuberculosis (Stop tuberculosis Partnership) para alcanzar la meta de impacto establecida en el marco de los ODM. Los objetivos de la Estrategia Alto a la tuberculosis son: conseguir el acceso universal a un diagnóstico de calidad y a un tratamiento centrado en el paciente, reducir el sufrimiento humano y la carga socioeconómica asociados a la tuberculosis, y proteger a las poblaciones vulnerables contra la tuberculosis, la coinfección tuberculosis/VIH y la tuberculosis multirresistente.

(http://www.who.int/tb/publications/2006/stoptb_strategy_sp.pdf)

La Estrategia Alto a la tuberculosis consta de seis grandes componentes (245):

- 1) Proseguir con la expansión de un programa DOTS de calidad y mejorarlo en cada uno de sus cinco componentes.
- 2) Hacer frente a la coinfección tuberculosis/VIH y a la tuberculosis multirresistente, mediante la implementación de actividades de colaboración en materia de tuberculosis/VIH y la prevención y el control de la tuberculosis multirresistente. Además, han de abordarse de manera específica aquellos grupos de riesgo o pacientes en situaciones especiales.
- 3) Contribuir al fortalecimiento de los Sistemas de Salud, mediante esfuerzos dirigidos principalmente a mejorar las políticas establecidas, los recursos humanos, la financiación, la gestión, la prestación de servicios y los sistemas de información.
- 4) Involucrar a todo el personal de salud, estableciendo colaboraciones entre los sectores público y privado y creando normas internacionales para la atención de los enfermos de tuberculosis.
- 5) Dar mayor capacidad de acción a los pacientes y a las comunidades, incrementando la participación de la comunidad en la atención antituberculosa y creando Estatutos del Paciente para mejorar su atención.
- 6) Favorecer y promover las investigaciones para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico, medicamentos y vacunas.

La Alianza Alto a la tuberculosis ha añadido otras dos metas de impacto, como son reducir a la mitad las tasas de prevalencia y de mortalidad para el año 2015 con respecto a los niveles de 1990. En este año, las tasas de prevalencia y mortalidad deberían ser 150 y 15 por 100.000 habitantes respectivamente. Además, la estrategia Alto a la tuberculosis tiene como compromiso eliminar la tuberculosis como problema de salud pública para el año 2050, es decir, reducir la incidencia de todas las formas de tuberculosis a un caso por millón (78).

Las tasas de prevalencia y mortalidad están disminuyendo en todo el mundo y en cada una de las seis regiones de la OMS. Sin embargo, en las regiones de África y Europa es previsible que no se logren alcanzar en 2015 las metas citadas, como resultado de los valores aún muy distantes en estas dos regiones entre las tasas de prevalencia y mortalidad registradas en 2007 y las metas fijadas (247).

2.2. MEDIDAS DE CONTROL LOCAL

ESTUDIO CONVENCIONAL DE CONTACTOS

El estudio convencional de contactos tiene como finalidad identificar a todos los sujetos con infección tuberculosa activa y a los casos secundarios entre las personas expuestas para poder interrumpir, en la medida de lo posible, la cadena de transmisión y someter a tratamiento quimioproláctico a todas aquellas personas que presenten una infección tuberculosa latente (1, 177).

Se considera “contacto” a toda persona sometida a riesgo de contagio por haber estado expuesta a una fuente de infección tuberculosa (1). El riesgo de que una persona resulte infectada depende de: las características del caso índice (baciloscopia positiva, presencia de cavitaciones, hábitos sociales), estado inmunológico del contacto y forma e intensidad de la exposición. Las personas inmunodeprimidas y los niños menores de cinco años tienen un riesgo de contagio más elevado (4).

Para determinar qué personas deben ser sometidas al estudio convencional de contactos, se establece el siguiente orden de prioridad según el riesgo de infección, salvo que existan circunstancias especiales o diferencias de elevada susceptibilidad que deben ser valoradas individualmente (1):

- 1) Riesgo alto: más de 6 horas al día de exposición en un ambiente favorable para el contagio, o si el contacto está inmunodeprimido, o si existe mas de un caso en relación con el contacto (brote epidémico).
- 2) Riesgo medio: menos de 6 horas de exposición.
- 3) Riesgo bajo: riesgo de contagio similar al de la población general.

Todos los contactos clasificados de riesgo alto o medio en los que no se haya documentado previamente una infección tuberculosa deberán ser sometidos a la prueba de la tuberculina y, si ésta resulta positiva y se ha descartado una tuberculosis activa, deberán comenzar el tratamiento quimioproláctico (4).

El estudio convencional de contactos sigue un sistema de “círculos concéntricos” que comienza por aquellos contactos con un riesgo alto de infección y va abarcando progresivamente a los contactos con riesgo de infección decreciente. El estudio se

extenderá hasta que la tasa de resultados positivos para la prueba de la tuberculina sea semejante a la esperada en la comunidad (4).

Existen determinadas situaciones y contextos epidemiológicos especiales que se han de tener en cuenta a la hora de realizar el estudio convencional de contactos, ya que por sus características se facilita el contacto entre un gran número de personas y la transmisión de la tuberculosis puede ser más favorable, como son: congregaciones, prisiones y correccionales, lugares de trabajo, hospitales, escuelas, asilos y casas de acogida (4).

Sin embargo, no siempre el estudio convencional de contactos logra identificar todos los casos implicados en una cadena de transmisión reciente. En este sentido, las nuevas herramientas de genotipado molecular han desvelado situaciones en las que la transmisión ha tenido lugar mediante un contacto esporádico o casual (144), o bien en entornos de transmisión diferente a los contemplados por el estudio convencional de contactos (141). Por este motivo, es importante el uso combinado de la epidemiología convencional y las técnicas de genotipado para ayudar a identificar de una forma más precisa los casos de tuberculosis implicados en una cadena de transmisión reciente (68).

3. AGENTE ETIOLOGICO DE LA TUBERCULOSIS

Existen diversos agentes etiológicos de la tuberculosis, todos ellos incluidos dentro del llamado “Complejo *Mycobacterium tuberculosis*”, que incluye las especies *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. bovis* y *M. microti*. *M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. canettii* son fundamentalmente patógenos humanos, mientras que *M. bovis* y *M. microti* son mayoritariamente los agentes causantes de la tuberculosis en animales, aunque pueden ser transmitidos al hombre (185). Se han descrito asimismo especies responsables de la infección de cabras y focas, que se han denominado *M. caprae* y *M. pinnipedi* (166). Todos ellos se caracterizan por compartir más de un 99% de su secuencia nucleotídica y presentar idéntica secuencia del gen 16S del ARNr (85, 106, 115, 205).

El género *Mycobacterium* está formado por bacilos rectos o ligeramente curvados, inmóviles, no esporulados, sin flagelos ni cápsula y con un alto porcentaje de guanina y citosina (G+C) en su ADN (157). Las micobacterias están estructuralmente más próximas a las bacterias Gram-positivas que a las Gram-negativas, aunque tampoco se acomodan en esta categoría, puesto que en su pared celular hay principalmente lípidos en vez de proteínas y polisacáridos.

El bacilo de la tuberculosis es un microorganismo prototrófico (sintetiza sus compuestos a partir de fuentes básicas de Carbono y Nitrógeno) y heterotrófico (utiliza compuestos orgánicos ya sintetizados como fuentes de Carbono y energía). Su estructura macromolecular y su estado fisiológico son el resultado de una gran adaptación a su entorno; la calidad nutricional de éste determina la forma de vida del bacilo, tanto en su hábitat natural, como en el medio de cultivo (166).

La característica principal que diferencia a las micobacterias es su pared celular, que presenta determinados ácidos grasos de alto peso molecular (entre 70 y 90 átomos de carbono) llamados ácidos micólicos, que constituyen más del 50% del contenido de la envuelta celular (183). La disposición de estos ácidos micólicos es específica de cada especie y es una propiedad utilizada en la identificación (166).

La cubierta lipídica citada anteriormente confiere al género *Mycobacterium* sus características principales, como son: resistencia a las soluciones de ácido-alcohol, alta hidrofobicidad, resistencia intrínseca a algunos antibióticos y propiedades inmunológicas distintivas. Determinados componentes de la pared, como el lipoarabinomano y el *cord*

factor intervienen en la patogenia y favorecen la supervivencia del microorganismo en el interior de los macrófagos (104). Además, probablemente también contribuya a la baja velocidad de crecimiento de algunas especies, entre ellas las incluidas en el complejo *M. tuberculosis*, ya que dificulta la captura de nutrientes por parte de la bacteria (166). En condiciones de laboratorio favorables, *M. tuberculosis* se divide aproximadamente cada 17 horas (183), lo que supone una tasa de crecimiento muy lenta en comparación con la mayoría de bacterias cultivables, que tienen un tiempo de duplicación que oscila entre 15 minutos y una hora. La estructura tan hermética de su pared es, sin duda, esencial para preservar la maquinaria metabólica y de replicación de la bacteria, la cual puede pasar a un estado de latencia cada vez que sea necesario. Esta característica parece ser la principal respuesta adaptativa del bacilo ante condiciones subóptimas o incluso extremas, tanto *in vitro*, como *in vivo* (166).

4. DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD

4.1. DIAGNOSTICO MICROBIOLÓGICO

La tuberculosis activa se diagnostica mediante la detección de bacilos pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* tanto en muestras respiratorias (tuberculosis pulmonar) como en extrarrespiratorias (tuberculosis extrapulmonar). A pesar de que en los últimos años se han desarrollado nuevas herramientas de identificación, el diagnóstico de la tuberculosis sigue recayendo en el examen microscópico y en el cultivo de las muestras clínicas (166). Sin embargo, el desarrollo de nuevas técnicas moleculares ha permitido una identificación más rápida y precisa de las distintas especies de micobacterias cultivadas (3).

4.1.1. Examen microscópico

El examen microscópico mediante la detección de bacilos AAR es el procedimiento más simple, barato y rápido para proporcionar al clínico un diagnóstico preliminar. Además, permite obtener una estimación cuantitativa de los bacilos que están siendo excretados y con ello identificar aquellos pacientes que son más infecciosos (3). Asimismo, resulta útil para monitorizar la respuesta de los pacientes al tratamiento antimicrobiano (10).

Los métodos para determinar la presencia de micobacterias AAR se basan en su resistencia intrínseca a la pérdida de coloración, tras aplicar un colorante primario, después de la exposición a soluciones de ácido-alcohol o ácidos minerales. Los métodos de tinción más utilizados son: a) tinciones basadas en la utilización de fucsina fenicada (carbolfucsina) como colorante primario. Estas son, la clásica de Ziehl-Neelsen o variantes como la tinción de Kinyoun, donde los microorganismos se tiñen de rojo sobre un fondo azul o verde (Figura 4), dependiendo del colorante de contraste utilizado; y b) métodos que utilizan como colorante primario determinados fluorocromos (auramina O, auraminarodamina) donde los microorganismos que son AAR, bajo la luz ultravioleta, aparecen fluorescentes de color amarillo o naranja, dependiendo del filtro empleado (Figura 4). La diferencia básica entre ambos métodos radica en el aumento microscópico requerido y, por tanto, en el número de campos a visualizar. De esta forma, los métodos con carbolfucsina precisan el examen con un ocular-objetivo de inmersión de gran

Introducción

aumento (x 1.000). En cambio, las técnicas fluorescentes requieren menos esfuerzo, al poder observar la preparación con un ocular-objetivo de menor aumento (x 250) sin pérdida de sensibilidad. Esto permite una mayor rapidez de lectura y un menor cansancio del microscopista, siendo por tanto el método de cribado recomendado en los laboratorios con un gran número de muestras (10).

Figura 4. Observación microscópica de *M.tuberculosis* mediante tinción de Ziehl-Neelsen (izquierda) y tinción de auramina (derecha).



Todas las tinciones en las que se observe la presencia de bacilos AAR deberán informarse como positivas, especificándose el método de tinción empleado. Además, ha de aportarse también una estimación de la cantidad de bacilos AAR presentes en la muestra clínica, usándose frecuentemente el esquema de cuantificación propuesto por la American Thoracic Society (Tabla 2)

Tabla 2. Interpretación e informe de la microscopía (baciloscopía) para la detección de bacilos AAR (3).

Informe	Tipo de tinción, aumento óptico y nº de BAAR observados		
	Fucsina (x 1.000)	Fluorocromo (x 250)	Fluorocromo (x 450)
No BAAR	0	0	0
Dudoso (repetir)	1-2 / 300 campos (3 barridos)	1-2 / 30 campos (1 barrido)	1-2 / 70 campos (1,5 barridos)
Positivo 1+	1-9 / 100 campos (1 barrido)	1-9 / 10 campos	2-18 / 50 campos (1 barrido)
Positivo 2+	1-9 / 10 campos	1-9 / campo	4-36 / 10 campos
Positivo 3+	1-9 / campo	10-90 / campo	4-36 / campo
Positivo 4+	>9 / campo	>90 / campo	>36 / campo

Las tinciones negativas no descartan la tuberculosis, ya que se ha observado que únicamente entre el 50% y el 80% de las muestras de pacientes con tuberculosis presentan tinciones positivas (3)

En la identificación microscópica pueden cometerse errores de dos tipos (10):

- 1) Errores por defecto (falsos negativos): muestras no representativas (saliva en vez de esputo, volumen escaso de orina, jugo gástrico no tamponado, etc.), extensiones demasiado gruesas o finas, mala fijación de la extensión, mala calidad de los colorantes, exceso de decoloración, defectos de observación (pocos campos examinados, fatiga del observador, escasa atención o experiencia, etc.).
- 2) Errores por exceso (falsos positivos): son los más graves, y pueden ser debidos a la presencia de restos de alimentos en el esputo, precipitados del colorante, contaminación cruzada de los portaobjetos durante las tinciones y/o uso de agua contaminada con micobacterias ambientales, contaminación a través del aceite mineral con el objetivo de inmersión, o puede tratarse de otros microorganismos con propiedades de AAR.

4.1.2. Cultivo

El aislamiento de micobacterias a partir del cultivo de muestras clínicas continúa siendo fundamental para el diagnóstico específico de las infecciones por estos microorganismos. El cultivo ha demostrado ser más sensible (únicamente requiere la presencia de 10^2 bacterias viables/ml) que el examen microscópico. Además, el aislamiento del agente causal permite la identificación de la especie, los posteriores estudios de sensibilidad frente a los antimicrobianos, así como la monitorización del tratamiento y curación del paciente (10).

Existen tres tipos de medios de cultivo de micobacterias: medios basados en huevo (Lowestein-Jensen), medios basados en agar (7H10 y 7H11 de Middlebrook) y medios líquidos (7H9 de Middlebrook, Dubos, Youmans, Proskauer-Beck, etc., y sistemas comerciales). Los medios líquidos son medios muy enriquecidos que recuperan un mayor número de micobacterias y de manera más rápida que los medios sólidos. Por ello se aconseja incluirlos siempre para el aislamiento primario de muestras clínicas. Además, estos medios se utilizan como base para diversas pruebas de identificación bioquímica y de sensibilidad a los antimicrobianos. Por el contrario, presentan la

desventaja de no poder visualizar la morfología de la colonia (Figura 5) ni valorar los posibles cultivos mixtos. Actualmente, uno de los medios líquidos más utilizados es el MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube), que consiste en un medio fluorométrico basado en el 7H9 de Middlebrook con un componente fluorescente. Bajo la luz ultravioleta el crecimiento se aprecia mediante la visualización de un brillo fluorescente anaranjado en la superficie y en el fondo del tubo como consecuencia de una disminución de la cantidad de oxígeno (3) (10).

En la actualidad, el cultivo de micobacterias se basa en la utilización de sistemas automatizados de incubación y lectura, en los que también pueden realizarse pruebas de sensibilidad a antimicrobianos, como los sistemas BACTEC 460 tuberculosis, MB/BacT ALERT 3D y MGIT 960. Estos sistemas presentan otras ventajas importantes, ya que la automatización elimina la manipulación del tubo, lo que conlleva la desaparición de posibles contaminaciones cruzadas (10).

Figura 5. Colonias de *Mycobacterium tuberculosis* en medio de cultivo sólido.



4.2. DIAGNOSTICO MOLECULAR

La principal ventaja del diagnóstico molecular consiste en su aplicación universal sobre todos los aislamientos, detección rápida, identificación de microorganismos de difícil cultivo y una adecuada relación coste-beneficio. Sin embargo, estas técnicas no pueden hoy día sustituir completamente a la metodología tradicional y algunas, como la secuenciación, requieren una inversión inicial elevada.

Existen dos tipos de técnicas de identificación molecular: 1) técnicas basadas en la utilización de sondas de ácidos nucleicos, que consisten en sondas comerciales de

ADN (sondas de AccuProbe® (GenProbe Inc., San Diego, Estados Unidos)) no radiactivas que permiten identificar, por hibridación con el ARNr micobacteriano, de forma rápida (2 horas) y específica, el complejo *M. tuberculosis*, y 2) técnicas basadas en la amplificación, mediante PCR, de secuencias específicas de ADN y posterior caracterización de los fragmentos de amplificación (PCR-RFLP del gen *hsp65*, secuenciación de la subunidad ribosomal 16S, hibridación en fase sólida (INNO-LiPA® Mycobacteria (Innogenetics NV, Gante, Bélgica), GenoType® Mykobacterien (Hain Diagnostika, Nehren, Alemania), etc.) (10).

Detección directa de *M. tuberculosis* en la muestra clínica

Actualmente se han desarrollado diferentes métodos moleculares que permiten la detección del complejo *M. tuberculosis* directamente de las muestras clínicas con un evidente adelanto diagnóstico. Estos métodos se basan en la amplificación de regiones específicas del genoma del complejo *M. tuberculosis* (165). Existen tanto métodos basados en reactivos comerciales (AMPLICOR *M. tuberculosis* assay, BDProbeTec® ET (Becton Dickinson, Sparks, Estados Unidos)), como otros no comerciales que utilizan habitualmente las plataformas LightCycler® (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania), o ABI Prism 7700® (PE Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos)

4.3. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

Las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos deben realizarse con métodos microbiológicos que comprueben la eficacia de cada fármaco. Se considera que una cepa es resistente cuando el 1% del inóculo de la población bacteriana en estudio es resistente a una concentración prefijada de un determinado fármaco.

4.3.1. Métodos fenotípicos convencionales para la detección de resistencias

- Métodos basados en medios de cultivo sólidos: existen diversos métodos, pero el más utilizado es el “Método de las proporciones críticas”, descrito por Canetti y Grosset, en que se compara el número de colonias crecidas en presencia de diferentes

diluciones de antibiótico con las colonias cultivadas en medio sin antibiótico, interpretando el resultado a través de la proporción de colonias capaces de crecer en presencia del fármaco. Inicialmente, la técnica se diseñó para su utilización en medio de Löwenstein- Jensen y para los fármacos de primera línea, exceptuando la pirazinamida (10). Poco después se estandarizó para los medios 7H10 y 7H11 de Middlebrook. Este método ha sido recomendado como la prueba de sensibilidad de referencia frente a la cual han sido comparadas todas las pruebas de sensibilidad desarrolladas posteriormente (251). Los factores limitantes más importantes son el tiempo de incubación, de 3 a 4 semanas, y el cálculo del inóculo, debido a la tendencia de *M. tuberculosis* a formar agregados no homogéneos. Recientemente se ha introducido un nuevo método llamado “E-test”, basado en la utilización de tiras impregnadas de antibiótico aplicadas directamente sobre placas de medio de cultivo. Este método aporta la ventaja de determinar la CMI del fármaco gracias al gradiente de concentraciones del antibiótico a lo largo de la tira. Se trata de un método sencillo, aunque requiere cierta experiencia en su lectura y tiene un coste superior al resto de técnicas basadas en medio sólido (10).

- Métodos basados en medios de cultivo líquidos: a partir de 1980 fue introducido como método de análisis de sensibilidad de los aislados de *M. tuberculosis* el sistema radiométrico BACTEC 460 tuberculosis, que es una versión modificada del método de las proporciones (17). Está basado en la utilización de viales de cultivo, con medio 7H9 modificado, inoculados con la cepa a estudiar y conteniendo la concentración adecuada de antibiótico. La estandarización del inóculo se logra estableciendo una asociación entre un crecimiento y una determinada lectura radiométrica (10). Los viales de la cepa a estudiar son leídos diariamente, interpretándose la sensibilidad y resistencia según la progresión de las lecturas de crecimiento respecto al control sin antibiótico. Este método proporciona resultados en un tiempo mucho menor (5-6 días) y diversos estudios han demostrado que los resultados obtenidos son comparables a los resultados obtenidos con el método de las proporciones (198), aunque presenta el inconveniente del manejo de sustancias radiactivas y su escasa automatización. En los últimos años han aparecido diversos sistemas no radiométricos para realizar las pruebas de sensibilidad, entre los que se encuentran el BACTEC MGIT 960, el MB/BACT ALERT 3D y el ESP Cultura System II. Todos ellos utilizan el medio de cultivo 7H9 modificado y el crecimiento se

evidencia mediante la detección de la producción de CO₂ o el consumo de O₂. El más utilizado es el BACTEC MGIT 960, que ha demostrado una gran reproducibilidad y una gran correlación con el método radiométrico (17). Las ventajas principales de este método son la incubación automatizada y la ausencia de radiactividad en el proceso.

El análisis de sensibilidad recomendado para los fármacos de primera línea es el análisis de dos concentraciones distintas de isoniazida y una concentración de rifampicina, etambutol y pirazinamida. Los antimicrobianos de segunda línea analizados son capreomicina, cicloserina, etionamida, kanamicina, ofloxacino, PAS, rifabutina y estreptomina. El análisis de todos estos fármacos de segunda línea, a excepción de la cicloserina, junto con el análisis de una concentración más elevada de etambutol, debe realizarse para todo aquel aislado resistente a rifampicina o resistente a dos o más de los fármacos de primera línea (251)

4.3.2. Métodos genotípicos para la detección de resistencia a fármacos de primera línea

La detección de resistencia mediante el uso de métodos moleculares se ha centrado en la identificación de resistencias a isoniazida y rifampicina.

Resistencia a isoniazida: está asociada fundamentalmente a la aparición de mutaciones en dos genes: el gen *katG* y el gen *inhA*. El primero codifica la enzima catalasaperoxidasa, implicada en la transformación de la isoniazida en su compuesto activo. La mutación más frecuente en este gen afecta al codón 315, provocando un cambio de aminoácido. El gen *inhA* codifica la enzima enoil ACP reductasa que participa en la síntesis de la pared bacteriana. Las alteraciones en el codón 315 del gen *katG* suelen asociarse a resistencia superior a 1 µg/ml, mientras que las vinculadas al gen *inhA* suelen ser inferiores o iguales a esta concentración.

Resistencia a rifampicina: la resistencia a este fármaco se encuentra, prácticamente en todos los casos, relacionada con mutaciones en el gen *rpoB*, que codifica la subunidad beta de la ARN polimerasa, evitándose, así, las interferencias causadas por la rifampicina en la transcripción. La mayoría de las cepas tienen alteraciones en una zona de 81 pb del gen que se conoce como *región determinante de la resistencia a la rifampicina* (RDRR). Las mutaciones más frecuentes son las que afectan a los codones 451 y 456. Al igual que con la isoniazida, se ha observado relación entre

las CMI's y las mutaciones. Así, las mutaciones de los codones 451 y 456 se asociarían a CMI's superiores a 32 µg/ml, mientras que las de los codones 436, 441, 443 y 447 se vincularían a CMI's más bajas.

La identificación molecular de resistencias tiene como ventajas la rapidez en la obtención de los resultados y su independencia del crecimiento bacteriano. Los principales métodos de identificación molecular son (10):

- Métodos basados en hibridación: LiPA (*Line Probe Assay*) es una técnica comercial desarrollada para la detección de las principales mutaciones de resistencia a rifampicina. Se basa en la hibridación del ADN de la cepa problema sobre una membrana en la que están fijadas sondas capaces de detectar individualmente cada una de las mutaciones más comunes en la RDRR del gen *rpoB*. Por otra parte, se han desarrollado técnicas no comerciales entre las que destacan las basadas en PCR e hidridación revelada por ELISA y las basadas en equipos de PCR a tiempo real. Estas últimas permiten la amplificación y detección del producto de forma simultánea utilizando sondas marcadas con moléculas fluorescentes. Las técnicas de PCR a tiempo real se han aplicado en la detección de las mutaciones implicadas en la resistencia a la rifampicina y a la isoniazida, tanto en aislamientos de cultivo como directamente en las muestras clínicas. Esta última posibilidad ofrece expectativas para detectar la resistencia con gran rapidez. No obstante, existen limitaciones que exigen su perfeccionamiento, como la baja sensibilidad en las muestras con baciloscopia negativa y la necesidad de dirigirse tan sólo a las mutaciones concretas conocidas.
- Métodos basados en la secuenciación: en la actualidad se considera el método de referencia, debido a que permite conocer la secuencia concreta de un fragmento, constatando todas las mutaciones presentes. Actualmente es aplicable únicamente a muestras procedentes de aislamientos de cultivo. Técnicamente es algo más compleja que el resto de los métodos. Sin embargo, existen equipos de secuenciación con un alto grado de automatización que, aunque son costosos, permiten que estas técnicas puedan plantearse como una alternativa real.

4.4. DIAGNOSTICO DE LA INFECCIÓN LATENTE POR *M. tuberculosis*

4.4.1. Prueba de la tuberculina

La prueba de la tuberculina se desarrolló en el siglo XIX y hoy en día continúa empleándose como la técnica más común para la detección de la infección latente por *M. tuberculosis* (147). Esta prueba está basada en la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado que se produce en un individuo infectado por *M. tuberculosis* cuando se le inyecta “tuberculina”, que es un derivado proteico purificado (Purified Protein Derivative o PPD), aunque también contiene ciertos lípidos y polisacáridos, formado por más de 200 antígenos pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*, pero que también son compartidos por otras micobacterias (3, 9).

La tuberculina se inyecta de forma subcutánea y, si existe infección latente por *M. tuberculosis*, las células T generadas durante la infección son reclutadas al lugar donde ha sido suministrada la tuberculina, produciendo una induración en esa zona. La reacción a la tuberculina comienza 5 ó 6 horas después de haber sido inyectada, produciéndose la máxima induración a las 48 ó 72 horas, siendo tras este período de tiempo cuando deben leerse los resultados de la prueba (3).

Los resultados deben ser interpretados por personal sanitario cualificado y debe comprobarse si existe induración en la zona de inyección de la tuberculina y, en ese caso, ha de medirse el diámetro de ésta. La Sociedad Torácica Americana ha establecido recomendaciones para determinar si la prueba de la tuberculina es positiva o negativa, según el diámetro de la induración y ciertas características del paciente (Tabla 3).

Sin embargo, la prueba de la tuberculina presenta la limitación de poder presentar falsos positivos en aquellas personas vacunadas por BCG o infectadas por micobacterias no tuberculosas. Además, también se han observado falsos negativos en personas inmunodeprimidas. Otro problema añadido es la variabilidad que existe en cuanto a la forma de administración, lectura de los resultados y respuesta biológica (147).

Tabla 3. Recomendaciones para la estimación de positividad en la prueba de la tuberculina (3)

Induración \geq 5 mm	Induración \geq 10 mm	Induración \geq 15 mm
<p>Personas VIH-positivas</p> <p>Contactos recientes de un caso de TB</p> <p>Cambios fibróticos en la radiografía de tórax consistentes con una TB anterior</p> <p>Pacientes con órganos transplantados y otros pacientes inmunodeprimidos (recibiendo al equivalente a $>15\text{mg/día}$ de prednisona durante $>1\text{mes}$)</p>	<p>Personas procedentes de países de alta incidencia con un tiempo transcurrido desde su llegada $<$ 5 años</p> <p>Adictos a drogas inyectadas</p> <p>Residentes y empleados de instituciones donde existe un riesgo de transmisión elevado</p> <p>Personal del laboratorio de micobacteriología</p> <p>Personas con factores de riesgo para desarrollar un TB (silicosis, diabetes melitus, insuficiencia renal, ciertos desórdenes hematológicos etc.</p> <p>Niños $<$ 4 años, niños y adolescentes expuestos a adultos que se encuentren dentro de las categorías de riesgo</p>	<p>Personas sin factores de riesgo para TB</p>

4.4.2. Métodos alternativos a la prueba de la tuberculina

Actualmente existen nuevos métodos para el diagnóstico de la tuberculosis latente basados en la medición *ex vivo* del IFN- γ liberado por las células T en respuesta a la estimulación con dos antígenos de *M. tuberculosis* (antígenos ESAT-6 y CFP-10) (9, 67). Entre este tipo de ensayos, denominados IGRAs, se encuentran el T-SPOT-tuberculosis y el QuantiFERON®-tuberculosis Gold y han demostrado ser más específicos que la prueba de la tuberculina, ya que no se ven afectados por la vacunación por BCG y no muestran reacciones cruzadas con micobacterias no tuberculosas, y en personas inmunocomprometidas su sensibilidad es mayor que la obtenida con la prueba de la tuberculina (9). No obstante, ciertos estudios han sugerido que la positividad obtenida con estos ensayos es menor que la ofrecida por la tuberculina, aunque no está claro si esta menor positividad se debe a una mayor especificidad o a una menor sensibilidad (67).

La mayor desventaja que presentan estos ensayos es su elevado coste; sin embargo, en países sin limitaciones económicas, su utilización es cada vez mayor. En este sentido, el CDC ha recomendado que la prueba de la tuberculina sea reemplazada por el QuantiFERON®-tuberculosis Gold y las recomendaciones británicas lo han

propuesto como prueba confirmatoria para aquellos casos con prueba de tuberculina positiva (9)

5. MANIFESTACIONES CLÍNICAS, TRANSMISION Y TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS

5.1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA TUBERCULOSIS

Ciertas enfermedades y condiciones físicas que hacen que el sistema inmune se debilite son factores que facilitan el desarrollo de la tuberculosis. Entre ellos se encuentran: VIH/SIDA, diabetes, malnutrición, alcoholismo, edad avanzada, insuficiencia renal crónica, leucemias, tumores, tratamiento con inmunosupresores, silicosis, gastrectomía y factores hereditarios (3).

Las manifestaciones clínicas de la tuberculosis son muy variables y dependen de un gran número de factores, tanto de la bacteria como del hospedador. Existen una serie de síntomas de naturaleza sistémica, que son independientes del órgano o tejido infectado y que engloban: fiebre, pérdida de apetito, pérdida de peso, debilidad, sudoración nocturna y malestar general (3). Todos ellos son síntomas comunes a otras enfermedades y dificultan, por tanto, el diagnóstico de la tuberculosis. En ocasiones la tuberculosis es asintomática, descubriéndose de forma casual o mediante el estudio de contactos de un enfermo tuberculoso (18)

Existen diferentes tipos de tuberculosis dependiendo de su localización anatómica:

- tuberculosis pulmonar: es la forma más común de tuberculosis en un adulto inmunocompetente. El síntoma principal es la tos y, conforme avanza la enfermedad y como resultado de la inflamación y necrosis del tejido, se produce el esputo, que es clave para el diagnóstico de la enfermedad. Puede estar asociada a dolor pleural, como resultado de la inflamación del parénquima pulmonar adyacente; la disnea no es un síntoma muy frecuente, aunque la tuberculosis puede provocar, sin embargo, un fallo respiratorio severo (3).

En un paciente con tuberculosis primaria (resultado de una infección reciente) las anomalías radiológicas más frecuentes son: 1) infiltrado parenquimatoso en campos medios o inferiores, con frecuencia asociado a adenopatías hiliares homolaterales, 2) adenopatía hilar o paratraqueal que provoca en ocasiones atelectasia por compresión y 3) patrón miliar, que corresponde a la forma más grave y que es la expresión de la

diseminación hematológica, habitualmente silente, que ocurre durante la primoinfección, siendo más frecuente en niños de corta edad o en pacientes inmunodeprimidos. En estas formas clínicas a menudo no se consigue el diagnóstico bacteriológico, porque suelen estar asociadas a lesiones cerradas con menor población bacilar, siendo la radiología y una prueba de la tuberculina positiva las claves para identificarla (18).

En la tuberculosis pulmonar postprimaria, que es aquella que se desarrolla como resultado de una reactivación endógena de una infección latente adquirida años antes, la localización más frecuente de las lesiones es en los segmentos apicales y posteriores de los lóbulos superiores, y apicales de los lóbulos inferiores de uno o ambos pulmones. Las formas radiológicas son muy diversas, pudiendo observarse cualquier patrón radiológico; sin embargo, lo más frecuente es la presencia de un infiltrado a menudo cavitado unilateral o bilateral. La cavitación es debida a la necrosis caseosa y es el signo más evocador de tuberculosis, pero en absoluto exclusivo. En la tuberculosis pulmonar cavitada, la bacteriología del esputo o del broncoaspirado es casi siempre positiva, siendo, por tanto, la forma más contagiosa de la enfermedad (18).

- tuberculosis extrapulmonar: es una forma menos común de la enfermedad; su diagnóstico presenta mayores dificultades que la tuberculosis pulmonar, ya que afecta a zonas que son menos accesibles y donde, además, se requiere una menor cantidad de bacilos para causar un daño mucho mayor. Todo esto hace que la confirmación bacteriológica sea menos frecuente (166).

Existen diversas formas de tuberculosis extrapulmonar, aunque las más relevantes son las detalladas a continuación (166):

- tuberculosis miliar o diseminada: es el resultado de una diseminación masiva del bacilo de la tuberculosis por el torrente sanguíneo. Los niños no vacunados, los ancianos y las personas inmunodeprimidas son más susceptibles a esta forma de tuberculosis. Los síntomas son inespecíficos e incluyen fiebre, anorexia y pérdida de peso, aunque, dependiendo del órgano, afectado pueden aparecer otros síntomas más específicos.

- tuberculosis pleural: es la forma más común de tuberculosis extrapulmonar. En la mayoría de los casos se produce varios meses después de la infección primaria

y los síntomas son fiebre, tos seca, disnea y dolor torácico. La prueba de sensibilidad a la tuberculina (TST) puede ser negativa en el momento del diagnóstico y volverse positiva durante el tratamiento con antituberculosos.

- tuberculosis ganglionar: es la segunda forma más común de tuberculosis extrapulmonar en pacientes VIH-negativos y la más común en VIH-positivos y enfermos de SIDA. La localización preferente es la cadena ganglionar cervical. Primeramente, los ganglios crecen de forma lenta y no causan dolor, pero después el volumen de éstos aumenta, tienden a fusionarse y suelen formarse fístulas. La prueba de la tuberculina suele ser muy positiva, excepto en pacientes inmunodeprimidos.

- tuberculosis en el Sistema Nervioso Central: presenta dos formas básicas, meningoencefalitis y tuberculoma intracraneal. La frecuencia de meningoencefalitis ha disminuido mucho desde que se introdujo la vacunación con BCG, aunque ha aumentado en adultos jóvenes con VIH/SIDA. Los síntomas incluyen apatía, letargia, fiebre y trastornos mentales como irritabilidad, dificultad de comprensión, alteraciones de la personalidad, desorientación y confusión mental. También se han observados otros síntomas como vértigo, vómitos y migraña.

- Otras localizaciones extrapulmonares: se han observado diversas formas de tuberculosis extrapulmonar. Entre ellas, las más comunes son la tuberculosis genitourinaria, renal y osteoarticular, aunque también existen formas menos comunes, como tuberculosis cutánea y ocular, que suelen ser consecuencia de inoculación accidental, o tuberculosis del tracto digestivo, que suele producirse tras la ingestión de alimentos contaminados.

5.2. TRANSMISIÓN Y DESARROLLO DE LA TUBERCULOSIS

La tuberculosis se transmite de una persona a otra a través de micropartículas aerosolizadas de una a cinco micras de diámetro que contienen bacilos del complejo *M. tuberculosis*. Estas partículas son exhaladas por personas con tuberculosis pulmonar o laríngea al toser, estornudar, hablar o cantar. También pueden generarse en procedimientos que conduzcan a la formación de aerosoles, como inducción de esputo, broncoscopias y durante la manipulación de tejidos infectados o procesamiento de muestras en un hospital o laboratorio. El diámetro reducido de estas micropartículas

favorece su persistencia prolongada en el aire y, una vez inhaladas, pueden alcanzar los alvéolos pulmonares, donde los bacilos de *M. tuberculosis* se replican. (3).

Hay cuatro factores que determinan la probabilidad de transmisión de *M. tuberculosis*:

- 1) Número de bacilos expulsados al aire
- 2) Concentración de estos bacilos en el aire, que viene determinada por el espacio y ventilación de la habitación
- 3) Tiempo de exposición
- 4) Estado inmunológico del individuo expuesto

Existen una serie de medidas que ayudan a reducir el número de bacilos de tuberculosis presentes en el aire de una habitación, como son la ventilación, la radiación con luz ultravioleta y la utilización de mascarillas con un tamaño de poro adecuado en pacientes bacilíferos durante el período anterior a la negativización del esputo mediada por la terapia (3).

Una vez que un individuo se ha contagiado con el bacilo de tuberculosis, la naturaleza de su respuesta inmune determinará si la infección progresa o es contenida. Aquellas personas capaces de desarrollar una respuesta inmune eficaz para contener los bacilos de tuberculosis desarrollarán una infección latente por un período de tiempo indeterminado. El riesgo de progresar hacia la forma clínica de la enfermedad es más alto durante los primeros tres a cinco años tras la infección, especialmente en personas inmunodeprimidas. Según esto, la enfermedad puede tener lugar durante la fase inicial de la infección (tuberculosis primaria), debido a una infección con una carga bacilar elevada, elevada patogenicidad/virulencia por parte de la bacteria y/o factores que disminuyen la respuesta inmune del hospedador. En este caso, la enfermedad se desarrollaría transcurridos unos meses tras la infección. La otra forma de enfermedad es la llamada tuberculosis postprimaria, que se produce después de que haya transcurrido un período prolongado tras la fase inicial de infección y suele deberse a una ruptura en el equilibrio entre la bacteria y el sistema inmune del hospedador en aquellos individuos con una tuberculosis latente (166).

5.3. TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS

El primer agente antituberculoso efectivo descubierto fue la estreptomina en 1944, cuyo inconveniente era la facilidad de adquisición de resistencias frente al mismo. Con el fin de minimizar esta limitación, en 1950 fue introducida la terapia combinada con estreptomina y PAS. En 1952, la isoniazida fue añadida a esta terapia combinada, lo que incrementó notablemente la eficacia del tratamiento, aunque aún seguían siendo necesarios períodos prolongados de administración (18-24 meses), con inyecciones dolorosas y efectos secundarios, lo que dificultaba mucho la adherencia al tratamiento por parte de los pacientes. En 1960, el PAS fue sustituido por el etambutol y a finales de esta década fue descubierta la rifampicina, que permitió pasar a un tratamiento por vía oral y de tan sólo nueve meses de duración (163). Finalmente, en 1980, se introdujo la pirazinamida, que permitió reducir la duración del tratamiento a seis meses (166).

El objetivo del tratamiento antituberculoso no es sólo curar al paciente y prevenirle de una recaída, sino que también se pretende conseguir que el paciente deje de ser infeccioso lo antes posible, romper la cadena de transmisión y evitar la aparición de resistencias. En el tratamiento de la tuberculosis hay que tener en cuenta, por tanto, que es necesaria la administración de más de un fármaco al que el microorganismo haya mostrado susceptibilidad, ya que la utilización de un número insuficiente de los mismos lleva asociada la selección de mutantes resistentes. En la mayoría de las situaciones clínicas es necesaria la utilización de, al menos, tres fármacos, los cuales deben incluir antibióticos altamente bactericidas (destrucción de bacilos en estado de crecimiento activo) y otros con alta capacidad esterilizante (destrucción de bacilos en estado persistente, con crecimiento lento) (18).

El fármaco con mayor capacidad bactericida es la isoniazida, seguida de la rifampicina, la pirazinamida y la estreptomina. Los fármacos con mayor capacidad esterilizante son la pirazinamida y la rifampicina; mientras que la isoniazida ofrece una escasa capacidad esterilizante (18). Teniendo en cuenta estas consideraciones, los regímenes de tratamiento actuales se dividen en una fase intensiva inicial de dos meses de duración, en la cual los tres fármacos se administran conjuntamente y, en ocasiones, junto a un cuarto fármaco, generalmente etambutol, y una fase de continuación de cuatro meses de duración, donde se administra isoniazida y rifampicina (163). En la fase intensiva del tratamiento, la isoniazida es responsable de la eliminación del 95% de los

bacilos durante los dos primeros días de tratamiento y su actividad bactericida es sustituida por la rifampicina y la pirazinamida según avanza esta fase inicial. En la fase de continuación con isoniazida y rifampicina, la rifampicina es el único fármaco efectivo contra aquellos bacilos que se encuentran en estado de latencia (150).

Además de los fármacos considerados como antituberculosos de primera línea en el tratamiento de la tuberculosis (isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol y estreptomina), se dispone de fármacos de segunda línea (amikacina, kanamicina, capreomicina, PAS, cicloserina, etionamida, protionamida y varias fluoroquinolonas) (166), que suelen utilizarse en los casos de tuberculosis resistente, aunque son fármacos menos efectivos, con un coste más elevado, mayores efectos secundarios asociados y que requieren períodos de tratamiento más prolongados (de nueve meses a un año) (163).

5.4. VACUNAS CONTRA LA TUBERCULOSIS

La única vacuna disponible actualmente para la tuberculosis es el Bacilo de Calmette Guerin (BCG), constituida por una cepa viva atenuada de *M. bovis* aislada por primera vez por Calmette y Guerin de una vaca con tuberculosis. Esta cepa fue subcultivada sucesivamente en el laboratorio y, al cabo de trece años, se observó que había perdido su virulencia. La vacuna con BCG fue aplicada por primera vez en humanos en 1921 y actualmente se estima que más de un billón de personas la han recibido (http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index4.html#vaccine).

BCG protege frente a formas severas de tuberculosis en niños, incluyendo tuberculosis miliar y meningitis tuberculosa, aunque la eficacia de su protección es menor en adultos y adolescentes y varía mucho de unas regiones geográficas a otras. Además, se han documentado casos de tuberculosis en inmunodeprimidos vacunados con BCG. Las razones que explican la reducida eficacia de esta vacuna son las diferencias existentes en el estado inmunológico del hospedador, diferencias en las diferentes cepas de BCG utilizadas para preparar la vacuna en los distintos países, y factores nutricionales y socio-económicos de las distintas poblaciones. Sin embargo, debido a la protección que ofrece frente a las formas más severas de tuberculosis infantil, la OMS continúa recomendándola en el calendario de vacunación de países con alta incidencia y

prevalencia de tuberculosis. Actualmente la vacunación con BCG es obligatoria en 64 países (166).

Recientemente, se han generado nuevas cepas de BCG, que han sido modificadas genéticamente para sobreexpresar un determinado antígeno o estimular la producción de una determinada citoquina, y que podrían ser candidatas a nuevas vacunas contra la tuberculosis, aunque las diferencias entre las cepas BCG usadas por los distintos laboratorios para construir estas nuevas vacunas pueden provocar diferencias en la respuesta inmune que generan

(http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index4.html#vaccine).

En los últimos años, la anotación del genoma completo de *M. tuberculosis* junto con el desarrollo de nuevas técnicas de análisis genómico han proporcionado un nuevo marco para el desarrollo de nuevas vacunas contra la tuberculosis basadas en la inactivación de genes relevantes en la virulencia del bacilo. En este sentido, se ha llevado a cabo la generación de mutantes atenuados de *M. tuberculosis* como nuevos candidatos a posibles vacunas contra la tuberculosis (8). Uno de estos mutantes es el mutante SO2, que ha demostrado ser más atenuado que BCG y conferir una inmunidad equivalente a esta última en modelo murino y superior en ensayos con cobayas (140). Estudios adicionales ayudarán a asegurar la eficacia de estos nuevos mutantes como vacunas contra la tuberculosis y a demostrar su elevado nivel de protección en los distintos individuos.

6. EPIDEMIOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS

INCREMENTO DE LA TUBERCULOSIS Y ANALISIS DE LOS FACTORES IMPLICADOS

La tendencia decreciente en el número de casos de tuberculosis que se había registrado en los países industrializados entre 1950 y 1980, gracias a los programas de control de la tuberculosis y a la introducción de los nuevos fármacos desarrollados para su tratamiento, comenzó a cambiar a partir de 1985, tanto en Europa como en Estados Unidos (116) (149). Las principales causas de este cambio fueron dos: la pandemia del VIH, que provocó que un gran número de personas que tenían una infección latente por *M. tuberculosis* desarrollasen la enfermedad (116), y la falta de solidez de los programas de control de la tuberculosis en estos países, que consideraban que la enfermedad estaba prácticamente eliminada. Al no existir un sistema de seguimiento y vigilancia adecuado, los pacientes abandonaban el tratamiento o no lo cumplían correctamente (48) (39).

Otros factores sociales, como el aumento de la mendicidad derivado del empeoramiento de las condiciones económicas, el alcoholismo y el abuso de sustancias inyectadas por vía parenteral en ciertas subpoblaciones, también contribuyeron al incremento en el número de casos de tuberculosis, debido a la dificultad para asegurar un buen cumplimiento del tratamiento en estos grupos sociales (39). Este fallo terapéutico llevó asociado un aumento en el número de casos de tuberculosis resistente y multiresistente (116, 149). En Europa del Este, principalmente en los países miembros de la antigua Unión Soviética, es donde se produjo un mayor aumento de los casos de tuberculosis multiresistente, que posteriormente fueron exportados a Europa Occidental debido a la inmigración desde estas regiones, como resultado de la crisis socio-económica (149).

6.1. Brotes de Tuberculosis

En determinadas regiones, la existencia de brotes ha conllevado asimismo situaciones que han resultado en un incremento de las tasas de tuberculosis. En 1992 tuvo lugar en Estados Unidos un brote de tuberculosis multiresistente que afectó a más de 100 personas en 21 hospitales de la ciudad de Nueva York, de los cuales el 82% eran pacientes coinfectados con el VIH (154). Este brote fue causado por una única cepa de

M. tuberculosis y sus variantes clonales, que eran resistentes a los cuatro fármacos de primera línea y a algunos de segunda línea. Esta cepa se denominó W y se vio que había sido responsable de dos brotes documentados anteriormente en uno de los hospitales de esta ciudad y en la prisión del Estado de Nueva York, respectivamente (5, 221). La cepa W llegó a ser endémica en el Estado de Nueva York, donde provocó más de 350 casos, y posteriormente se extendió a otros Estados y a Puerto Rico. Las tasas de mortalidad debidas a la infección por dicha cepa fueron superiores al 80% (7).

En esta década de los 90 también surgieron casos de tuberculosis multirresistente en pacientes coinfectados con VIH en hospitales y prisiones de otros países (60, 153, 172, 182). La coinfección tuberculosis-VIH hace que la progresión hacia la forma clínica de la enfermedad sea rápida y si las medidas de control son escasas, la transmisión entre pacientes con VIH/SIDA puede provocar una rápida diseminación de una misma cepa MR (154). Durante esta época, en muchas instituciones no había facilidades para el aislamiento de los pacientes con tuberculosis, produciéndose condiciones de hacinamiento que aumentaban la transmisión de la enfermedad. Además, en muchos casos, el tratamiento suministrado a estos casos de tuberculosis multirresistente era inadecuado y la tasa de cumplimiento del mismo en los enfermos coinfectados con el VIH era baja. Todas estas circunstancias hicieron que los hospitales y otras instituciones no estuviesen preparados para hacer frente al incremento tan dramático de la tuberculosis en esta población (153).

Debido a los grandes brotes producidos, las medidas de control y tratamiento de la tuberculosis en los países industrializados se reforzaron, principalmente en aquellas comunidades con un alto riesgo para la infección por tuberculosis, y su incidencia comenzó a disminuir (145). En Estados Unidos y en los países miembros de la Unión Europea esta tendencia decreciente se ha mantenido a lo largo de los últimos años (42, 111), mientras que en muchos países en vías de desarrollo de África, Asia y América Latina, la tuberculosis continúa siendo una amenaza para el sistema de Salud Pública, ya que las tasas de incidencia continúan siendo muy altas, poniéndose de manifiesto que el número de casos de tuberculosis está obviamente relacionado con la situación económica del país (166).

6.2. Tuberculosis e inmigración

A pesar de la tendencia decreciente en el número de casos de tuberculosis detectada en las últimas décadas en los países industrializados, debida principalmente al control de la infección por el VIH en estos países, el aumento en el número de casos de tuberculosis entre la población inmigrante ha producido una desaceleración de dicha tendencia (42, 111, 145, 180). Esta población inmigrante procede principalmente de regiones donde la incidencia de tuberculosis es elevada y, como consecuencia de la inestabilidad económica y política existente en sus países de origen, se ven forzados a emigrar a otras regiones con una situación económica más favorable (180).

En Estados Unidos el 57% de los casos nuevos de tuberculosis se detectan entre la población extranjera y, dentro de esta población, el mayor número de casos se observa entre los inmigrantes procedentes de África Subsahariana y el Sureste de Asia. Además, los mayores porcentajes de resistencia a isoniazida corresponden a las poblaciones procedentes de Vietnam (20%) y Perú (18%) (42).

En la Unión Europea los casos de tuberculosis en población extranjera alcanzan el 20%, variando desde un 40 a un 100% en los distintos países. El mayor porcentaje de casos de tuberculosis se observa igualmente en inmigrantes procedentes de Asia y Africa, aunque también se ha registrado un porcentaje importante (7%) de casos de tuberculosis entre los inmigrantes procedentes de países miembros de la antigua Unión Soviética. Estos países de Europa del Este poseen también tasas muy altas de tuberculosis multirresistente, que oscilan entre el 10 y el 21% de los casos (111). El incremento en los casos de tuberculosis multirresistente y tuberculosis extremadamente resistente en los países de Europa Occidental está asociado mayoritariamente a casos extranjeros procedentes de estas regiones (80).

El mayor riesgo de desarrollo de la enfermedad entre la población inmigrante tiene lugar durante los primeros años tras su llegada al país receptor (132) (61) (164) y el riesgo de poseer una infección latente por *M. tuberculosis* es mayor entre los inmigrantes de edad más avanzada, ya que el tiempo de exposición a la tuberculosis en su países de origen ha sido mayor (42). Ciertos factores, como déficit en la alimentación, estrés y condiciones de vida precarias, son habituales en los primeros años de entrada de la población inmigrante en el país receptor (100, 164), haciendo que aumente la vulnerabilidad a la enfermedad por el efecto que dichos factores tienen en el sistema

inmunológico (164). Además, la dificultad para acceder al sistema de salud pública de los inmigrantes que se encuentran en situación ilegal aumenta el riesgo de que, al desarrollar la enfermedad, el caso de tuberculosis no sea notificado a los sistemas de Salud Pública (29)

Aunque, en la mayoría de los casos, la tuberculosis en la población inmigrante se debe a una reactivación endógena de una infección adquirida en sus países de origen, la reinfección exógena puede ser responsable de hasta el 20% de los casos en algunas poblaciones, según han demostrado estudios recientes de epidemiología molecular (19, 96, 169). La enfermedad predomina en varones jóvenes, ya que son los que se encuentran ligados al fenómeno migratorio, siendo la localización pulmonar la más frecuente. La coinfección tuberculosis-VIH es menos habitual, excepto en aquellas poblaciones que proceden del Africa Subsahariana, donde la incidencia del VIH es muy elevada (73).

A pesar de que existe cierta controversia, por sus posibles connotaciones discriminatorias, el chequeo para la detección de tuberculosis en la población inmigrante en el momento de su llegada al país receptor es una práctica común en Europa, Norteamérica y Australia (36). Además, se ha propuesto como especialmente recomendable diagnosticar y tratar la infección tuberculosa latente en la población inmigrante procedente de zonas donde la incidencia de tuberculosis es elevada (42, 100)

El impacto que la población inmigrante tiene en la población autóctona en relación con la transmisión de la tuberculosis varía según los estudios, ya que mientras que algunos autores han puesto de manifiesto que la inmigración no tiene ninguna influencia en la transmisión de la tuberculosis en la población autóctona (61), otros autores han demostrado que existe una gran permeabilidad en dicha transmisión entre ambas poblaciones (12, 31, 71).

6.3. Cepas prevalentes y factores de riesgo asociados a su transmisión

La cepa W, anteriormente comentada y responsable de un gran número de casos en Estados Unidos, pertenece a una familia de cepas de *M. tuberculosis* muy conservada genéticamente y ampliamente distribuida por todo el mundo denominada familia W-Beijing. Su nombre se debe a que inicialmente se identificó como predominante en la zona de Pekín (Beijing) en China (responsable del 92% de los casos), aunque, posteriormente, muchos estudios han demostrado que es común en otras zonas (Asia, Texas, Estonia y Cuba, entre otras (102)). Además, ha estado implicada en grandes brotes

de tuberculosis, como el descrito en Nueva York (154), o el de la isla de Gran Canaria, donde en 1996 la cepa más común aislada en esta isla pertenecía a la familia Beijing, a pesar de su baja prevalencia en el resto de España (44). Inicialmente, se consideró que esta familia estaba asociada a una mayor tendencia a desarrollar resistencia o multirresistencia. Sin embargo, a pesar de que diversos estudios han demostrado una relación significativa entre la familia W-Beijing y la resistencia a fármacos (27, 70, 128), otros autores, por el contrario, no han observado una mayor resistencia entre estas cepas comparadas con el resto de las cepas aisladas en las mismas regiones (44, 57).

En cuanto a los factores de riesgo asociados a la infección por la familia Beijing, un estudio realizado en Vietnam encontró una asociación entre la edad y la infección por estas cepas (16) y estudios recientes realizados en Sudáfrica han demostrado una estrecha asociación entre la infección por cepas pertenecientes a esta familia y la infección por VIH en esta región (148). A pesar de todo, la amplia distribución internacional de esta familia, junto a su frecuente implicación en brotes, sugiere que estas cepas poseen una mayor capacidad de diseminación (102).

Además de la familia W-Beijing, otras cepas han sido asimismo destacadas por su elevada prevalencia en determinadas regiones. Una de estas es la cepa C, sensible a antituberculosos, ampliamente distribuida en Nueva York desde los años 90 y cuya infección está asociada con el abuso de sustancias inyectadas por vía parenteral (154), siendo una de las cepas más frecuentemente aislada en esta ciudad en población indigente y VIH-positiva entre los años 2001 a 2004 (134). En el Reino Unido la cepa CH fue la responsable de un brote que afectó a 235 escolares en Leicester en el año 2000, debido a un mal establecimiento de las medidas de vigilancia, tratamiento y control de la tuberculosis (239). Otros ejemplos de cepas prevalentes en determinadas zonas son la cepa Harlingen en Holanda, cepa asociada a población autóctona o de Surinam (123, 229); la cepa MTZ en Zaragoza, cepa sensible sin factores de riesgo asociados a su transmisión (133), y la cepa responsable del denominado Cluster 2 de Dinamarca, asociada a hombres jóvenes nacidos en Dinamarca (131). Algunos autores han sugerido que la alta prevalencia de estas cepas aisladas en determinadas regiones podría ser debida a que poseen una mayor virulencia y transmisibilidad (133, 154), particularmente en aquellos casos en los que las características de los pacientes afectados no pudiesen explicar el motivo de su elevada prevalencia (133).

7. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE LA TUBERCULOSIS

La Epidemiología Molecular surge al integrar la Biología Molecular, la Medicina Clínica, la Estadística y la Epidemiología (144). En esencia, esta disciplina está dirigida a estudiar el papel que juegan factores de riesgo ambientales y genéticos en la etiología de la enfermedad y en su distribución en la población. En relación con las enfermedades infecciosas, la Epidemiología Molecular utiliza una aproximación multidisciplinar para identificar los factores causantes de la enfermedad, su propagación /diseminación y su distribución, lo cual se lleva a cabo principalmente mediante una asociación de las características epidemiológicas con los rasgos genotípicos de los aislados clínicos (144).

El entendimiento de la transmisión de la tuberculosis mejoró notablemente gracias a la introducción de las técnicas de genotipado a principios de los años 90, cuando una amplia variedad de marcadores genéticos para *M. tuberculosis* fueron identificados (127). Los métodos utilizados hasta entonces para la identificación de cepas se basaban en la morfología de las colonias, velocidad de crecimiento, sensibilidad a determinados antibióticos y tipado mediante la utilización de fagos. Todos estos métodos resultaban imprecisos y no aportaban un poder de resolución suficiente para ser utilizados en el estudio de la epidemiología de la tuberculosis (144).

Sin embargo, de todos los marcadores genéticos identificados, sólo un número reducido de ellos demostraron tener una capacidad de discriminación y una reproducibilidad suficientes para ser implementados a gran escala (126, 127). El principio de la era genómica en el estudio de la tuberculosis comenzaría en 1998 con la publicación del genoma completo de la cepa de laboratorio H37Rv (51). A pesar de que el genoma del complejo *M. tuberculosis* está altamente conservado en relación con el de otros patógenos bacterianos, se han observado regiones con polimorfismos genéticos, algunos de ellos consistentes en secuencias monoméricas repetidas periódicamente y que comúnmente se denominan repeticiones en tándem de número variable o VNTRs (Variable-number tandem repeats) (144).

En general, a la hora de elegir el marcador molecular adecuado para realizar un estudio de epidemiología molecular de la tuberculosis en una población determinada, hay que tener en cuenta la estabilidad del marcador y la variabilidad genética de las cepas de *M. tuberculosis* en esa población. La tasa de cambio del marcador genético debe ser lo

suficientemente rápida como para distinguir entre cepas no relacionadas epidemiológicamente y lo suficientemente lenta para permitir agrupar aquellos casos relacionados epidemiológicamente (144). El poder de discriminación de un marcador genético se considera adecuado cuando la probabilidad de considerar idénticas dos cepas no relacionadas es inferior al 5% (índice de diversidad de Simpson). Además, el método de genotipado elegido deber ser, preferiblemente, un método rápido, fácil, reproducible y de bajo coste.

7.1. PRINCIPALES TÉCNICAS DE GENOTIPADO DE *M. tuberculosis*

7.1.1. IS6110-RFLP

En 1993 este método fue adoptado como el método de genotipado estándar para el complejo *M. tuberculosis* (225) Esta técnica está basada en la variabilidad que existe dentro del complejo *M. tuberculosis* tanto en el número, como en la posición dentro del genoma de la secuencia de inserción IS6110. En esta técnica, el cromosoma de *M. tuberculosis* es digerido con la enzima de restricción *Pvu* II, los fragmentos de restricción son separados mediante electroforesis en gel de agarosa e hibridados con una sonda cuya secuencia es complementaria a IS6110. Los fragmentos de restricción generados que contienen esta secuencia de inserción son detectados por quimioluminiscencia (Figura 6). El desarrollo de programas para el análisis de los patrones de RFLP ha permitido establecer comparaciones entre los patrones de los aislados clínicos de los distintos laboratorios y se han creado bases de datos de genotipos tanto a nivel nacional como internacional (107, 127, 209, 226).

La principal ventaja del IS6110-RFLP es su elevado poder de discriminación y una estabilidad biológica adecuada para los estudios de transmisión. Además, al ser una técnica ampliamente utilizada, existe una gran cantidad de genotipos disponibles para realizar comparaciones. Sin embargo, esta técnica presenta las siguientes limitaciones: requiere una gran cantidad de ADN purificado, implica un procedimiento lento y laborioso, requiere personal cualificado tanto para su realización como para la interpretación de los resultados (Figura 7), existe cierta subjetividad a la hora de asignar los genotipos y ofrece un bajo poder de resolución entre las cepas con un número bajo de copias de IS6110.

Figura 6. Esquema metodológico de la técnica IS6110-RFLP

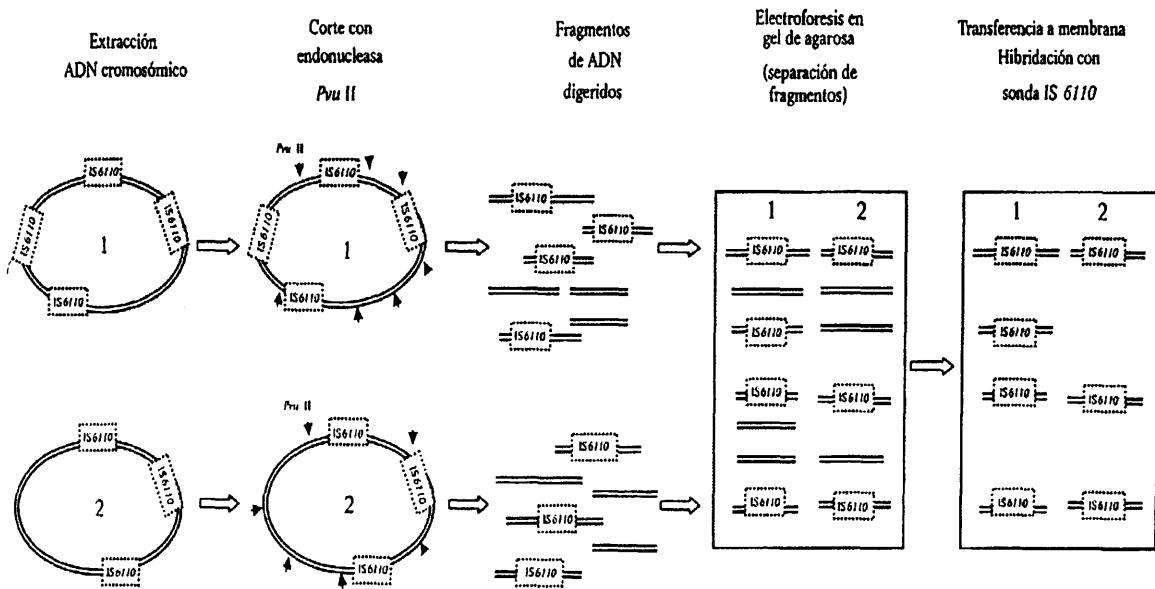
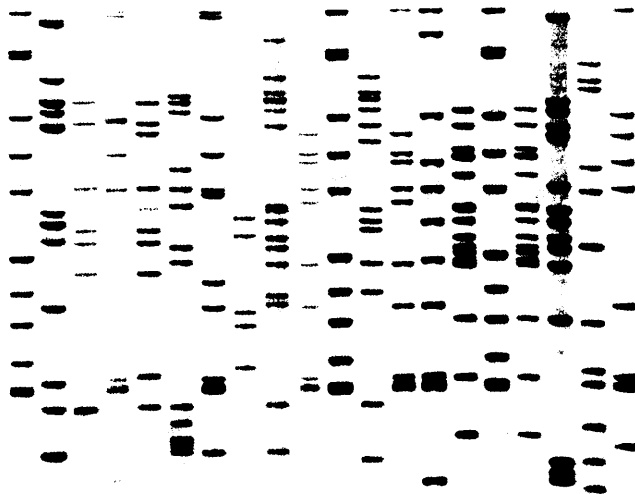


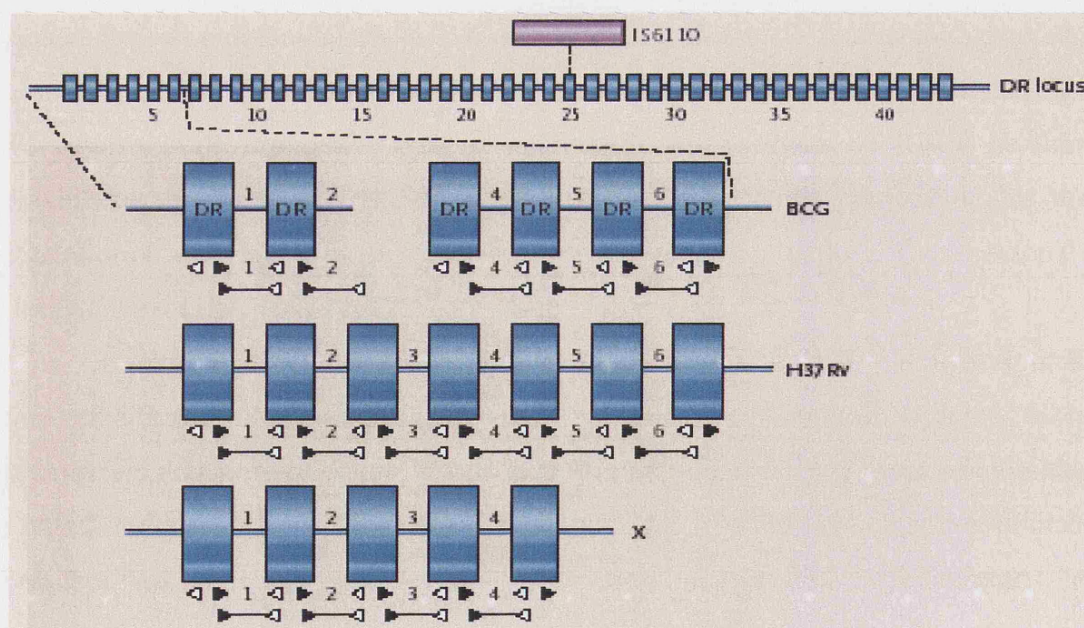
Figura 7. Imágenes de patrones IS6110-RFLP de aislados clínicos de MTBC



7.1.2. Spoligotipado

Esta técnica de genotipado basada en PCR fue desarrollada en 1997 por Kamerbeek y cols. (121) y analiza el polimorfismo en la secuencia RD (repeticiones directas) del complejo *M. tuberculosis*. La región RD consta de repeticiones directas separadas por espaciadores de secuencia única (43 espaciadores han sido descritos para el complejo *M. tuberculosis*). El producto de la amplificación por PCR de esta región es hibridado con una membrana que contiene inmovilizados 43 oligonucleótidos de secuencia complementaria a las secuencias de los 43 espaciadores (Figura 8). La presencia o ausencia de cada uno de estos espaciadores es determinada por quimioluminiscencia (Figura 9), estableciéndose así un genotipo para cada cepa que puede representarse en forma de código binario. El Spoligotipado ha sido utilizado principalmente como técnica de genotipado de segunda línea para analizar aquellos aislados de *M. tuberculosis* con menos de seis copias de IS6110 y para estudios de filogenia, ya que permite diferenciar entre familias genéticas de cepas.

Figura 8. Esquema metodológico de la técnica de Spoligotipado.

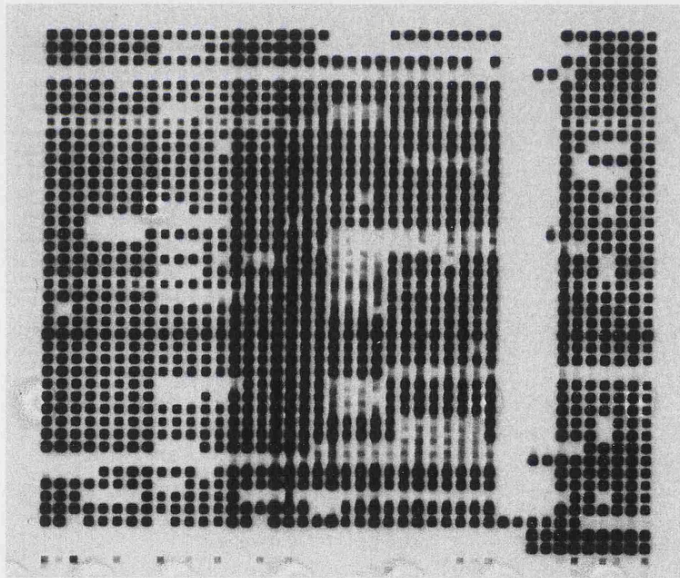


La principal ventaja de esta técnica es que, al estar basada en PCR, requiere pequeñas cantidades de ADN, el cual no es necesario que esté purificado. Además, es

una técnica más rápida y sencilla que el IS6110-RFLP en la que los resultados se representan en forma numérica, lo que permite una comparación sencilla de datos entre los distintos laboratorios. La gran desventaja de esta técnica de genotipado es su bajo poder de discriminación, ya que analiza una única región del cromosoma de *M. tuberculosis*.

Se dispone de una base de datos internacional de Spoligotipos denominada, en su última versión, SpolDB4, que contiene un total de 39.295 patrones pertenecientes a aislados de 122 países que se agrupan en 1939 Spoligotipos compartidos y que permite determinar la familia filogenética a la que pertenece una determinada cepa de *M. tuberculosis* (38).

Figura 9. Imágenes de spoligotipos de aislados clínicos de MTBC

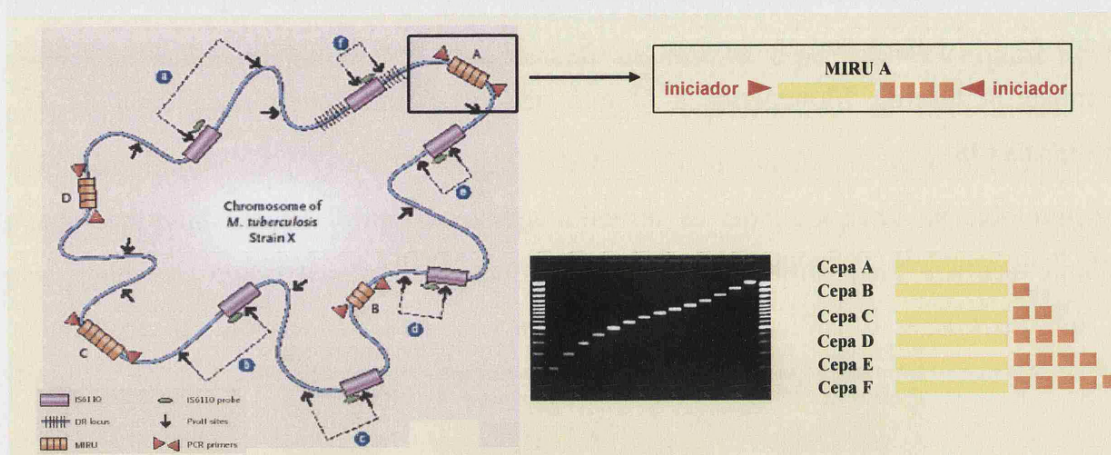


7.1.3. MIRU-VNTR

En 1997 Supply y cols. observaron que el genoma de *M. tuberculosis* poseía un elevado número de secuencias repetitivas de DNA, de entre 40 y 100 pb, a las que denominaron MIRU. La secuencia de nucleótidos de estas repeticiones es constante, pero las distintas cepas varían en el número de repeticiones que poseen en cada locus de MIRU (212). Esta técnica se basa en la amplificación mediante PCR de los distintos loci de MIRU utilizando parejas de primers que flanquean dichas regiones. Mediante el

análisis del tamaño de los fragmentos de amplificación obtenidos, se asigna el número de repeticiones que existe en cada uno de los loci (Figura 10). Los resultados son expresados en forma de un código numérico que hace referencia al número de repeticiones existente en cada uno de los loci analizados.

Figura 10. Esquema metodológico de la técnica MIRU-VNTR



De los 41 loci de MIRU identificados, inicialmente se seleccionaron 12 para el genotipado de *M. tuberculosis*, denominándose a este conjunto de loci MIRU-12 (211). Sin embargo, se observó que el poder de discriminación de MIRU-12 era inferior al de IS6110, excepto en aquellos aislados con un número reducido de copias de IS6110 (94, 120, 152, 187). Actualmente, un nuevo conjunto de 15 loci de MIRUs (MIRU-15), compuesto por 6 de los loci de MIRU-12 más 9 loci nuevos han sido propuestos como la nueva técnica de referencia para el genotipado de *M. tuberculosis* (210), ya que ha demostrado un poder de discriminación semejante al de la técnica IS6110-RFLP y ha resultado ser una herramienta útil para estudios de transmisión de la tuberculosis (162) (11, 13). Junto a este conjunto de 15 loci, un juego de 24 loci ha sido propuesto como herramienta molecular de alta resolución en estudios filogenéticos (210). Además, la técnica MIRU-VNTR es un método rápido, sencillo, reproducible y que permite obtener resultados a partir de pequeñas cantidades de ADN sin purificar. Recientemente se ha creado una base de datos internacional denominada MIRU-VNTRplus para facilitar el análisis y la comparación de resultados (14).

7.2. APLICACIONES DE LAS TÉCNICAS DE GENOTIPADO DE *M. tuberculosis*

7.2.1. Epidemiología molecular: Estudio de las dinámicas de transmisión de *M. tuberculosis*

Las técnicas de genotipado establecen como casos en “cluster” al conjunto de dos o más casos de tuberculosis cuyos aislados presentan un genotipo idéntico. En general, los casos en cluster son considerados miembros de una cadena de transmisión reciente.

Inicialmente, estas técnicas fueron aplicadas en el estudio de brotes de tuberculosis en determinadas regiones (54, 146, 222), permitiendo la identificación de casos relacionados que no se habían sospechado inicialmente (146).

Posteriormente, el uso de estas herramientas moleculares se ha extendido al análisis de cadenas de transmisión y se han realizado amplios estudios de epidemiología molecular en diferentes regiones del mundo (12, 49, 64, 131, 201, 232), identificándose un alto porcentaje de casos en cluster, que oscila del 40%, en zonas de baja incidencia de tuberculosis (49, 131, 201, 229), al 70% en zonas donde la incidencia es elevada (232). Por último, gracias a las técnicas de genotipado, se han revelado fenómenos de transmisión reciente entre contactos esporádicos fuera de los contextos habituales de transmisión (28, 158).

Al analizar la información molecular conjuntamente con los datos epidemiológicos, se identifica un cierto grado de discrepancia y únicamente en un porcentaje reducido de los casos en cluster se logra identificar el nexos epidemiológico (21, 33, 71, 108, 118, 194). Tan sólo en aquellos estudios en los que se ha llevado a cabo un análisis más refinado, ha logrado incrementarse el porcentaje de clústeres con nexos epidemiológicos probados (23, 141, 200, 223, 240). Por último, en algunas situaciones, determinados clusteres corresponden a la presencia de cepas prevalentes en una determinada región a lo largo del tiempo y no están asociados a un fenómeno de transmisión reciente (72, 134).

7.2.2. Caracterización de recurrencias

En la infección por *M. tuberculosis* se denomina recurrencia al desarrollo de un nuevo episodio de tuberculosis después de un episodio previo, el cual había sido considerado clínicamente curado (144).

Tradicionalmente se asumía que las recurrencias estaban causadas por una reactivación endógena de la cepa que inicialmente había sido aislada en el primer episodio (206). Sin embargo, una recurrencia también puede estar causada por una nueva cepa (reinfeción exógena). La aplicación de las técnicas de genotipado al estudio de recurrencias en tuberculosis ha permitido identificar genotipos diferentes entre aislados pertenecientes a episodios sucesivos en pacientes con tuberculosis recurrente en determinadas circunstancias de elevado riesgo de sobreexposición (59, 204, 228), poniéndose de manifiesto que la reinfeción exógena ha de considerarse en el estudio de recurrencias. Este fenómeno de reinfeción exógena se ha detectado, asimismo, en zonas con incidencia baja o moderada de tuberculosis (19, 43, 98), y tanto en pacientes VIH-positivos como VIH-negativos (98, 204).

7.2.3. Análisis de la complejidad clonal en la infección por *M. tuberculosis*

Del mismo modo que ocurría en las recurrencias, en la valoración de casos con un único episodio de tuberculosis también se asumía homogeneidad clonal. Sin embargo, la aplicación de estrategias de genotipado en este ámbito ha permitido detectar casos de infección simultánea con dos cepas de *M. tuberculosis* (32, 59), observándose en algunas situaciones incluso una compartimentalización de la infección, con diferentes cepas o variantes clonales de *M. tuberculosis* infectando compartimentos anatómicos diferentes (97, 99) o incluso distintas regiones del pulmón (122). En ocasiones, la no consideración de una infección simultánea con dos cepas diferentes ha provocado discrepancias en las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos y ha dificultado la asignación precisa de cadenas de transmisión (32, 252).

Aunque estos fenómenos de complejidad clonal son aceptados hoy en día, su frecuencia y significado apenas han sido estudiados (191), debido a que inicialmente la detección simultánea de dos cepas o variantes clonales era compleja y laboriosa, descansando bien en la interpretación de bandas de menor intensidad en los patrones de RFLP (66) o bien en la obtención y genotipado de colonias aisladas a partir de una muestra clínica (99). Sin embargo, la técnica de genotipado MIRU-VNTR ha demostrado ser una herramienta útil para detectar de manera sencilla estos fenómenos de complejidad clonal, observándose la presencia simultánea de dos productos de amplificación en uno o

varios loci, cuando dos variantes clonales o cepas de *M. tuberculosis* están presentes en un mismo aislado clínico (95).

La detección de estos fenómenos es relevante tanto a nivel clínico (diferentes cepas pueden tener diferentes perfiles de sensibilidad y/o diferentes comportamientos infectivos), como a nivel epidemiológico, ya que una reinfección exógena en un paciente con tuberculosis recurrente indica que ha tenido lugar un fenómeno de transmisión reciente, lo que resulta determinante a la hora de poner en marcha el estudio convencional de contactos.

7.2.4. Análisis de la distribución geográfica de cepas de *M. tuberculosis*

La introducción de marcadores genéticos para *M. tuberculosis* ha permitido estudiar la filogenia de esta bacteria, así como los cambios que han tenido lugar en la estructura y distribución de su población, lo que ha llevado a la identificación de grandes familias filogenéticas distribuidas por todo el mundo (75, 230, 238).

La base de datos actual de Spoligotipos (SpolDB4) (38) ha permitido definir la distribución geográfica de las distintas familias filogenéticas, así como identificar aquellas familias que son predominantes en una determinada región.

Entre los 62 linajes descritos en SpolDB4, cabe destacar siete de ellos por su amplia distribución:

- Familia EAI: descrita por primera vez en Guinea-Bissau (119) y frecuente en el Sureste Asiático, India y Este de Africa (127). Además, se caracteriza por presentar un número reducido de copias de IS6110, existiendo un subgrupo dentro de esta familia que sólo posee una única copia de esta secuencia de inserción.
- Familia W-Beijing: descrita por primera vez en 1995 por van Soolingen et al. (230) y que, como se ha comentado anteriormente, es una familia prevalente en muchas zonas de Asia, aunque posee una amplia distribución mundial.
- Familia CAS: presente en India y endémica en Sudán, otros países subsaharianos y Pakistán (38). Esta familia también posee un patrón distintivo de RFLP. Se piensa, además, que esta familia podría ser la antecesora de la familia W-Beijing.
- Familia Haarlem: fue descrita por primera vez en Holanda (127) y se ha constatado que es prevalente en el Norte de Europa. También se ha identificado, aunque en menor medida, en el Caribe y es prevalente también en Africa, donde se piensa que fue

introducida por colonizadores europeos (81). Esta familia posee un también un patrón característico de RFLP, aunque es muy diversa.

- Familia LAM: se caracteriza por la ausencia de los espaciadores 21-24 y por su gran diversidad, probablemente resultado de fenómenos de convergencia genética (236).
- Familia X: se ha identificado en Europa y también en Guadalupe y la Polinesia francesa. Los miembros de esta familia se caracterizan por un número reducido de copias de IS6110 y la ausencia del espaciador 18 en su Spoligo-tipo (189).

Además, recientemente se han empleado nuevas herramientas moleculares para realizar estudios de filogeografía, que consisten en clasificar la estructura poblacional global del complejo *M. tuberculosis* en linajes que se corresponden con determinados orígenes geográficos (linajes filogeográficos). Estos estudios consisten en analizar polimorfismos de secuencia larga (LSP), que son resultado de deleciones genómicas irreversibles, a menudo como resultado de eventos únicos y que resultan útiles para abordar estudios filogenéticos (37, 219). Se han propuesto 19 regiones LSP a partir de las cuales es posible clasificar la estructura poblacional global del complejo *M. tuberculosis* en 6 linajes que se corresponden con determinados orígenes geográficos (93).

Otra de las técnicas empleadas en estudios de filogenia es la basada en polimorfismos de secuencia única o SNPs, que son muy útiles para estudios evolutivos, ya que se mantienen a través de generaciones, facilitando el trazado de organismos relacionados. Mediante el análisis de SNPs, Sreevatsan et al. (205) dividieron el complejo *M. tuberculosis* en tres grupos genéticos (MGGs; *Major Genetic Groups*) caracterizados por secuencias específicas localizadas en el codon 463 del gen *katG* y el codon 95 del gen *gyrA* (205), aunque estudios recientes han subdividido estos tres grupos genéticos, considerando finalmente la existencia de 7 grupos filogenéticos o SCGs (*SNP Cluster Groups*), mediante el análisis de 159 SNPs (82).

7.2.5. Evaluación de los programas de control de la Tuberculosis

Las técnicas de genotipado de *M. tuberculosis* han puesto de manifiesto que un porcentaje considerable de los casos de tuberculosis son debidos a fenómenos de transmisión reciente incluso en áreas donde la incidencia de la tuberculosis es baja (156). El porcentaje de casos implicados en cluster se convierte en un indicador idóneo para: 1)

identificar las poblaciones diana de intervención preferente para controlar la transmisión, 2) monitorizar longitudinalmente la eficiencia de las medidas de control implementadas, que deben conducir a reducciones en este parámetro.

En 1996 el CDC inició un estudio prospectivo de cinco años que se denominó “Red nacional de vigilancia y genotipado de tuberculosis”, que sirvió como herramienta para la prevención y control de la tuberculosis, así como para analizar la diversidad de las cepas de *M. tuberculosis* presentes en los Estados Unidos, incluyendo diferencias por región y población, así como la prevalencia de cepas endémicas (47). Inicialmente los estudios de epidemiología sugerían que la mayor parte de la transmisión de la tuberculosis en los Estados Unidos ocurría entre contactos locales, pero estudios posteriores pusieron de manifiesto la existencia de una transmisión más amplia geográficamente y destacaron la necesidad de una colaboración entre las distintas jurisdicciones para mejorar el control de la tuberculosis (27, 46).

Además, la identificación de grupos de riesgo para la transmisión de la tuberculosis, ha permitido mejorar las medidas de control en determinados colectivos sociales y disminuir así su tasa de incidencia. Un ejemplo es el estudio realizado por Kong et al. (125) en Denver, donde se demostró el papel de las técnicas de genotipado en la medición de la eficacia de realizar la prueba de la tuberculina entre la población indigente. Estos autores observaron una disminución en el porcentaje de casos en cluster desde un 49%, durante los siete años anteriores al inicio del estudio, hasta un 14% al cabo de cuatro años tras la implementación del programa de control en esta población. Asimismo, en Nueva York, la identificación molecular de casos en cluster infectados por cepas de tuberculosis multirresistente permitió monitorizar la mejora de los programas de control de la tuberculosis en esta ciudad y además permitió identificar que la mayoría de estos casos ocurría en pacientes VIH-positivos y en trabajadores sanitarios (155).

El establecimiento de la contribución relativa de la transmisión reciente y la reactivación endógena a la incidencia absoluta de la tuberculosis es importante para fijar las medidas de control de tuberculosis que han de establecerse en una determinada región, ya que una predominancia de transmisión reciente indica que las medidas de control han de dirigirse a la identificación rápida de nuevos casos de tuberculosis. Por el contrario, la identificación de casos huérfanos, resultado de reactivaciones endógenas puede ser útil para identificar regiones/poblaciones donde concentrarse en la identificación de la infección latente (68).

7.2.6. Detección de contaminaciones cruzadas de laboratorio

Las contaminaciones cruzadas de laboratorio ocurren por un mal procesamiento de las muestras, lo que provoca la formación de aerosoles que contaminan muestras consecutivas, obteniéndose así un cultivo falso-positivo. La no identificación de un cultivo de *M. tuberculosis* falso-positivo supone la administración innecesaria de tratamiento, así como el inicio de un estudio de contactos.

Las técnicas de genotipado han permitido identificar de forma sencilla estos fenómenos y han puesto de manifiesto que tienen lugar con una frecuencia más elevada de la esperada inicialmente (25, 34, 40, 142). Una contaminación cruzada de laboratorio debe ser sospechada cuando: 1) únicamente se aísla *M. tuberculosis* en una de las muestras clínicas seriadas de un paciente, 2) la carga bacteriana del cultivo es reducida, 3) la muestra de la cual se sospecha un posible falso positivo se ha procesado conjuntamente (o en un periodo reducido de tiempo) con, al menos, un aislado perteneciente a un paciente con elevada carga bacilar y 4) se producen discrepancias entre los resultados microbiológicos y las observaciones clínicas. La sospecha de un falso positivo se confirma mediante la detección de genotipos idénticos en las muestras implicadas, tras comprobar la ausencia de nexos epidemiológicos.

8. PATOGENESIS, VIRULENCIA E INMUNIDAD

La infección por *M. tuberculosis* tiene lugar generalmente por vía respiratoria, a través de micropartículas aerosolizadas. Una vez que la bacteria ha alcanzado el pulmón, entra en contacto con los macrófagos alveolares que se encuentran en este tejido. Estas células del sistema inmune desempeñarán un papel crucial en la contención de la infección por este microorganismo, ya que tras la entrada en el hospedador, las micobacterias serán fagocitadas por los macrófagos.

La fagocitosis de *M. tuberculosis* requiere la unión a diversos receptores de la membrana plasmática del macrófago (171). El receptor mediante el cual se lleva a cabo esta unión *in vivo* aún no ha sido establecido con exactitud (113) y se han propuesto diversos receptores, como son: receptores del complemento, receptores de manosa y receptores “scavenger”. Uno de los receptores principales en la unión de la micobacteria con el macrófago que se ha descrito en estudios *in vitro* es el receptor RC3, teniendo también un papel clave el colesterol, ya que la unión entre la micobacteria y RC3 es dependiente de éste (171).

Sin embargo, *M. tuberculosis* es un patógeno intracelular que ha desarrollado distintas estrategias para permanecer dentro del macrófago y evitar ser destruido por las células del sistema inmune del hospedador. Tanto la evolución como las características de la infección dependerán, por tanto, de dos parámetros: la virulencia de la cepa de *M. tuberculosis* a la hora de infectar y la eficacia de la respuesta del hospedador infectado (171).

8.1. FAGOCITOSIS E INHIBICIÓN DE LA MADURACION DEL FAGOSOMA

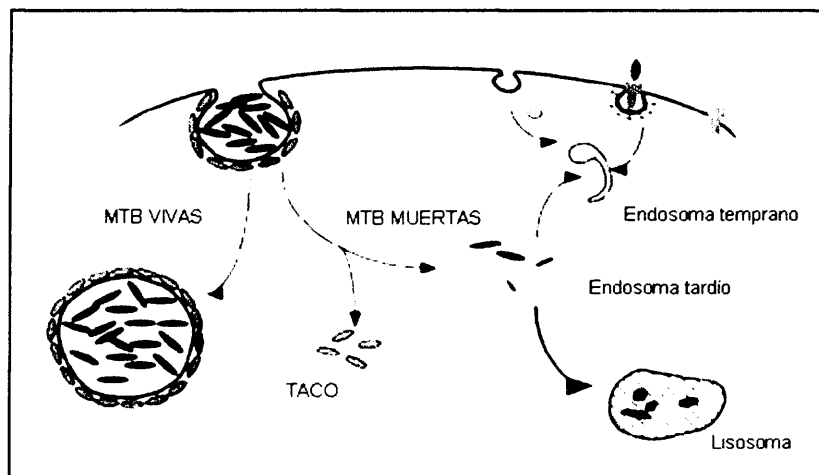
La fagocitosis es una forma especializada de endocitosis por la cual partículas grandes, entre las que se incluyen los microorganismos, son internalizadas en vesículas de gran tamaño denominadas fagosomas. Durante el proceso de fagocitosis el fagosoma se fusionará finalmente con los lisosomas, formando un fagolisosoma, donde el material fagocitado será degradado enzimáticamente (171).

Si el proceso normal de maduración del fagosoma tiene lugar, tras la fusión con los lisosomas, la micobacteria encontrará un ambiente hostil caracterizado por un pH ácido y la presencia de intermediarios reactivos de oxígeno, enzimas lisosomales y

péptidos tóxicos. En estudios realizados con ratón, se ha comprobado que los intermediarios reactivos de nitrógeno presentan una gran capacidad antimicrobiana. Sin embargo, su papel en humanos ha generado cierta controversia, aunque los macrófagos alveolares de la mayoría de pacientes con tuberculosis presentan actividad de la enzima NOS (203).

Sin embargo, las micobacterias patógenas son capaces de inhibir la fusión del fagosoma con los lisosomas y con ello su acidificación. Uno de los mecanismos que ha sido propuesto para evitar esta acidificación consiste en bloquear, en los fagosomas que contienen micobacterias, el aumento de ATP-etas que bombean protones al interior (203). Otro mecanismo adicional consiste en inhibir la maduración del fagosoma para evitar que sea reconocido por los lisosomas, jugando la proteína TACO un papel relevante, ya que es retenida activamente en aquellos fagosomas que contienen micobacterias en su interior (Figura 11) (171). A pesar de todo, no está claro que el bloqueo de la acidificación del fagosoma sea esencial para garantizar la supervivencia de *M. tuberculosis* dentro del macrófago (203).

Figura 11. Evasión de los mecanismos de defensa del macrófago por *M. tuberculosis* (171). Las micobacterias (azul) evitan la maduración de los fagosomas mediante la retención de la proteína TACO (amarillo) en su superficie



8.2. FACTORES DE VIRULENCIA DE *M. tuberculosis*

La virulencia de un microorganismo se define como la capacidad que éste tiene para evadir las defensas del organismo (137). *M. tuberculosis* no posee los factores de virulencia que han sido descritos para otros patógenos, tales como toxinas, moléculas de adhesión y moléculas de invasión. Por tanto, la virulencia de las cepas clínicas se ha evaluado generalmente con la estimación de la mortalidad producida en el modelo murino de tuberculosis experimental (136, 137).

Diferentes estudios han identificado diversos genes que tienen importancia en la patogénesis de la infección por *M. tuberculosis* y que han sido agrupados, de acuerdo con la función de la proteína que codifican, en las siguientes categorías (203):

- Secreción y envuelta celular: bajo esta categoría se agrupan genes que codifican proteínas que son secretadas por la bacteria o que intervienen en la síntesis de moléculas de la superficie celular, como por ejemplo la proteína de 19 kDa, que es un antígeno reconocido por las células T, o el glicolípido LAM, que constituye un importante inmunomodulador.
- Enzimas implicadas en el metabolismo celular: son aquellas implicadas en el metabolismo de ácidos grasos, ya que es la principal fuente de carbono usada por la bacteria durante su crecimiento en el interior de la célula infectada.
- Reguladores de la transcripción: son moléculas que controlan la transcripción de otros muchos genes, como son los “sistemas de dos componentes” empleados por la micobacteria para responder a cambios que tienen lugar en las características de su entorno a través de una cascada de señalización celular, como por ejemplo el sistema de dos componentes *PhoP*.

Determinadas moléculas han sido identificadas como factores de virulencia asociados a determinadas cepas de *M. tuberculosis*, como es el caso del fenol glicolípido derivado de la poliketido sintasa o PGL, producido por un subgrupo de cepas pertenecientes a la familia W-Beijing que han sido descritas como cepas hipervirulentas en modelos de infección murinos. Además, la interrupción de este gen conlleva la pérdida del fenotipo hipervirulento (176). Sin embargo, estudios posteriores han puesto de manifiesto que, a pesar de su papel inmunorregulador, la producción de PGL por una cepa diferente a las de la familia W-Beijing, no incrementa su virulencia, con lo que es

probable que, en estas cepas, sea también necesaria la acción sinérgica de otros factores de virulencia (199).

8.3. INTERACCION CON EL SISTEMA INMUNE

Generalmente, tras la infección por *M. tuberculosis*, el 90% de los individuos inmunocompetentes permanecen asintomáticos y las bacterias causantes de la infección son destruidas o permanecen viables, pero en un estado de latencia. Sin embargo, un 10% de los casos infectados desarrollará la sintomatología clínica relacionada con una tuberculosis activa, lo que indica que, en estos casos, los bacilos han sido capaces de evadir el control generado por la respuesta inmune del hospedador y comienzan a replicarse en el tejido infectado

En esta respuesta desarrollada por el sistema inmune del hospedador para controlar la infección por *M. tuberculosis*, están implicados tanto mecanismos de inmunidad innata, como mecanismos de inmunidad adaptativa (89). La respuesta inmunitaria innata es llevada a cabo principalmente por los macrófagos, que son las células que entran en contacto con la micobacteria en el momento inicial de la infección y que activarán múltiples mecanismos microbicidas que limitarán el crecimiento de la misma. Entre estos mecanismos se encuentra la producción de citoquinas proinflamatorias, como TNF- α , que limita el crecimiento de la micobacteria y es uno de los primeros efectores moleculares descritos como esenciales en la respuesta del hospedador contra *M. tuberculosis* (90). TNF- α es secretado por diversos tipos celulares, entre los que se incluyen macrófagos, neutrófilos y células T (231) y, además de reducir el crecimiento de la bacteria, también promueve la migración de macrófagos adicionales y células T al lugar de la infección (87).

Las células dendríticas también juegan un papel importante en esta respuesta innata, ya que mediante la fagocitosis de *M. tuberculosis*, procesamiento y presentación de antígenos en los ganglios linfáticos a las células T, inducirán la maduración de estas últimas.

La respuesta adaptativa contra *M. tuberculosis* es principalmente una respuesta de tipo Th1, que se denomina así porque es llevada a cabo por los linfocitos T colaboradores tipo 1 y se caracteriza por la producción, por parte de estas células, de IFN- γ e IL-12 (110). El IFN- γ es una molécula clave en la activación del macrófago, ya que aumenta la

capacidad microbicida de éste, mientras que IL-12 actúa como molécula inmunomoduladora, aumentando la producción de IFN- γ por las células T. Además de su papel en la activación del macrófago, el IFN- γ induce en estas células la autofagia, que es un mecanismo de autodestrucción que lleva en último término a la fusión del fagosoma con los lisosomas y a la destrucción de las micobacterias (113).

El conjunto de todos estos mecanismos conduce a la formación de granulomas en el lugar de la infección. Los granulomas son estructuras formadas por agregados de células inmunes, principalmente macrófagos y células T (53). Los granulomas han sido considerados como estructuras beneficiosas para la contención del crecimiento de las micobacterias (220). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que el reclutamiento de nuevos macrófagos a la zona de infección para la fagocitosis de las células infectadas supone para las micobacterias la presencia de nuevos nichos donde poder replicarse (63). El TNF- α se ha considerado una molécula clave en la inducción de la formación de granulomas, ya que promueve la migración y la agregación de linfocitos (186), aunque estudios realizados recientemente han puesto de manifiesto que, aunque esta molécula mantiene la integridad del granuloma, no es necesaria para su formación (50).

El segundo tipo de respuesta adaptativa que existe es la respuesta Th2, que es llevada a cabo por los linfocitos T colaboradores de tipo 2 y que se caracteriza por la producción de citoquinas antiinflamatorias, entre las que destaca la IL-10, que conduce a una respuesta humoral llevada a cabo por los linfocitos B (110). La IL-10 reprime la capacidad microbicida de los macrófagos inhibiendo la producción de IFN- γ por las células Th1 (30).

Finalmente, el control de la infección por *M. tuberculosis* dependerá del balance entre las respuestas Th1 y Th2. Si predomina la respuesta tipo Th1 o proinflamatoria, predominará una respuesta celular que conducirá a la activación de los macrófagos, con la consiguiente destrucción de la micobacteria, mientras que si el balance se inclina hacia una respuesta tipo Th2 o antiinflamatoria, predominará una respuesta humoral que conducirá a la desactivación de los macrófagos y no se contendrá el crecimiento de la micobacteria.

8.4. MEDIDA DE LA VIRULENCIA DE *M. tuberculosis*

Tradicionalmente, la virulencia de *M. tuberculosis* se ha medido según la capacidad que tiene una cepa para replicarse en determinados órganos en modelos de infección establecida en ratón y cobaya. Estos estudios son costosos y requieren períodos prolongados de tiempo para su análisis. Además, existen diferencias entre las distintas especies animales en cuanto al transcurso de la infección y los mecanismos de protección desarrollados por cada organismo para contenerla, lo que limita la aplicabilidad de estos modelos animales a la hora de establecer una relación con la infección en humanos (56, 76, 86, 88, 184)

Estas limitaciones han inducido la búsqueda de modelos celulares de infección alternativos, más sencillos de manejar y que proporcionan resultados más rápidamente (217). En este sentido, los modelos de infección que utilizan macrófagos humanos, tanto en cultivo primario, como líneas celulares de monocitos transformados, como la línea celular THP-1, han demostrado ser útiles para analizar los primeros estadios de la infección y han sido utilizados para medir las tasas de replicación intracelular de los aislados de *M. tuberculosis*, y para estimar, por tanto, la virulencia de las cepas (130, 136, 216, 254).

Gracias a la existencia de los modelos de infección se ha podido establecer una relación entre la virulencia observada en determinadas cepas y su capacidad de replicación, tanto en modelos animales como celulares. Un ejemplo es el caso de la cepa HN878 (también conocida como cepa 210), perteneciente a la familia W-Beijing y causante de diversos brotes que tuvieron lugar en Estados Unidos durante los años 90. Esta cepa ha demostrado un fenotipo hipervirulento, debido a que la supervivencia de los ratones infectados con esta cepa es mucho menor en comparación con los ratones infectados con otras cepas, incluida la cepa de referencia H37Rv (136). Además, se ha comprobado también que esta cepa se replica más rápidamente en un modelo celular de macrófagos humanos (254). Asimismo, estos modelos de infección también han puesto de manifiesto que la cepa CDC1551, que en un principio se creía que era una cepa especialmente virulenta, debido a que provocó un brote con altas tasas de seroconversión en la prueba de la tuberculina, en realidad no posee una capacidad de replicación intracelular más elevada (136).

Las diferentes cepas de *M. tuberculosis* han desarrollado diferentes mecanismos de control de la respuesta inmune. En este sentido, diferentes estudios que han analizado la virulencia de determinadas cepas de *M. tuberculosis* han puesto de manifiesto que son capaces de contener la producción de TNF- α , inhibiéndose así la activación de los linfocitos T, o de adelantar la producción de IL-10 para inhibir la producción de IFN- γ y con ello la activación de los macrófagos. La capacidad de control de la respuesta inmune observada en estas cepas se ha correlacionado, además, con una mayor tasa de replicación en modelos de infección animales y celulares y también con una mayor capacidad de diseminación en la comunidad (136, 214).

8.5. INFECCION LATENTE

Incluso después de un control eficiente de la infección por el sistema inmune del hospedador, algunos bacilos permanecen en un estado no replicativo durante el resto de la vida del individuo. Este estado se denomina estado de latencia o infección tuberculosa latente, es clínicamente asintomático y la mayoría de los casos de tuberculosis activa surgen como resultado de una reactivación de los bacilos latentes (168).

Los factores que desencadenan este estado de latencia son la baja concentración de oxígeno y de nutrientes presente en los granulomas generados como consecuencia del control de la infección primaria, así como la producción local de TNF- α y NO (91, 168, 234).

Además, estudios recientes han sugerido que otros tejidos, como el tejido adiposo, pueden constituir un reservorio donde los bacilos pueden persistir largos períodos de tiempo en estado de latencia, evitando ser reconocidos por las células del sistema inmune y ser destruidos por los fármacos antituberculosos, que no podrían penetrar en este tejido (161).

Actualmente, se ha sugerido una nueva hipótesis alternativa al modelo tradicional de latencia en la infección por tuberculosis. Esta hipótesis asume que el estado de latencia es, en realidad, un estado dinámico en el que tienen lugar sucesivas reinfecciones endógenas mediante las cuales, tras el constante reciclaje que tiene lugar en el hospedador de las células que ya han sido infectadas, el bacilo infectaría nuevas células del sistema inmune donde volvería a entrar nuevamente en un estado de latencia. Este modelo explicaría la eficacia del tratamiento con isoniazida, ya que este fármaco sólo

elimina eficientemente aquellos bacilos que se encuentran en estado de replicación activa y no actuaría sobre aquellos que se encuentran en estado latente (45).

8.6 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GENICA DURANTE LA INFECCIÓN POR *M. tuberculosis*

Uno de los mayores hitos en cuanto al conocimiento sobre *M. tuberculosis* durante la última década fue la descripción del genoma completo de la cepa de referencia de laboratorio H37Rv (51). El genoma de *M. tuberculosis* H37Rv contiene 4.411.529 pb y un contenido en G+C elevado (65.5%) y uniforme a lo largo de todo el genoma, excepto en un grupo de genes donde este contenido alcanza el 80% y compone una familia de genes exclusivos de las micobacterias que pertenecen a la familia de proteínas PE o PPE (51). Las proteínas PE y PPE constituyen el 10% del genoma de *M. tuberculosis* y se cree que tienen un papel importante en la supervivencia y replicación de la micobacteria (139).

El conocimiento del genoma completo junto con el desarrollo de la tecnología de microarrays ha permitido realizar estudios de genómica comparativa y genómica funcional con el fin de identificar factores asociados con la patogénesis de *M. tuberculosis*, tales como factores de virulencia y genes implicados en la persistencia del patógeno en las células del hospedador. La tecnología de microarrays proporciona una herramienta idónea para analizar cuáles son las causas que determinan el diferente comportamiento observado entre distintas cepas de *M. tuberculosis*, ya que permiten un análisis global del genoma. En este sentido, el análisis con microarrays ha permitido documentar la presencia de determinadas deleciones asociadas a cepas con una elevada virulencia (174), así como analizar del perfil de expresión génica de *M. tuberculosis* durante el proceso de infección y establecer cuáles son los genes esenciales para la supervivencia de la bacteria dentro del macrófago (178).

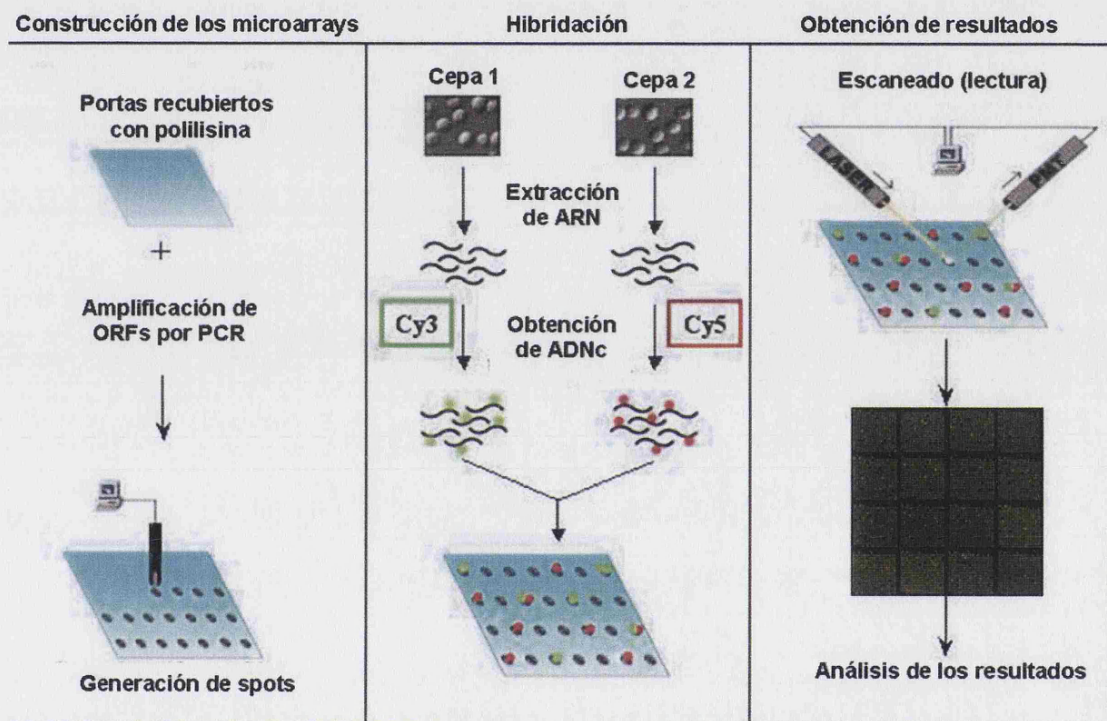
8.6.1. Microarrays

Los microarrays consisten en micromatrices de diversos materiales, habitualmente cristal tratado con polilisina, en los que se encuentran inmovilizados, en una elevada densidad (aproximadamente 2000 spots/cm²), oligonucleótidos de entre 50 y

70 mers que representan cada gen del genoma. Los oligonucleótidos actúan como sondas de hibridación para medir la abundancia relativa de secuencias complementarias de ADN, ARNm o ADNc marcadas con fluoróforos (41) (Figura 12).

Los microarrays se utilizan principalmente para estudios de genómica comparativa y genómica funcional

Figura 12. Esquema metodológico de la técnica de microarrays



8.6.2. Genómica comparativa

El fundamento de la genómica comparativa es comparar el genoma completo de las distintas cepas de *M. tuberculosis* con las cepas de referencia, cuyos genomas ya han sido secuenciados, para identificar la presencia de deleciones diferenciales en la cepa que se quiere analizar. Actualmente están publicadas las secuencias de dos genomas de *M. tuberculosis* (cepas H37Rv y CDC1551) y dos de *M. bovis* (cepas AF2122/97 y BCG Pasteur). Estas cepas han sido utilizadas para identificar las regiones de diferencia responsables del fenotipo avirulento de la cepa BCG, identificándose la región RD1

como la única región ausente en todas las cepas BCG y presente en las cepas patógenas. Otros estudios han comparado la cepa H37Rv con su homóloga avirulenta H37Ra, encontrándose también regiones delecionadas en esta última y que podrían ser responsables de su fenotipo atenuado (166).

Este tipo de estudios también han permitido identificar la presencia de polimorfismos con significado fenotípico y han sido aplicados para la caracterización de cepas implicadas en brotes (174), permitiendo la identificación de determinadas secuencias presentes en la cepa de referencia pero ausentes en diferentes aislados clínicos. La existencia de deleciones específicas se ha asociado a determinadas cepas hipervirulentas de la familia Beijing (218). Desafortunadamente, la técnica de microarrays no permite detectar genes presentes en las cepas clínicas pero ausentes en la cepa de referencia (166).

8.6.3. Genómica funcional

A diferencia de la genómica comparativa, la genómica funcional utiliza el perfil de expresión de ARNm para identificar el transcriptoma de una célula en una condición específica o en un momento determinado.

Los microarrays han sido utilizados para monitorizar el perfil de expresión de *M. tuberculosis* en una gran variedad de condiciones ambientales, tales como hipoxia (167, 195), choque térmico (207), falta de carbono (24), estrés ácido (83), etc. Estos estudios han permitido identificar respuestas a determinadas condiciones relacionadas con el entorno que encuentra *M. tuberculosis* durante el proceso de infección y han revelado el estado metabólico en el que se encuentra la bacteria en una determinada condición.

Existen diversos estudios que han analizado el perfil de expresión de *M. tuberculosis* dentro de la célula hospedadora, así como el perfil de expresión de esta última en respuesta a la infección. Estos estudios coinciden en que los cambios que tienen lugar en el perfil de expresión génica de la micobacteria dentro del macrófago están implicados en: 1) cambio de respiración aerobia a respiración anaerobia, 2) metabolismo de ácidos grasos y 3) remodelación de la envuelta celular (92, 188, 213). Además, la combinación de los microarrays y la técnica de mutagénesis por inserción de transposones ha permitido identificar genes que son esenciales para la supervivencia de la bacteria dentro del macrófago, como son: genes para la β -oxidación de ácidos grasos,

componentes del sistema de secreción de ESAT-6, que es un importante antígeno estimulador de células T y transportadores de disacáridos y fosfato inorgánico. Estos resultados sugieren que la supervivencia intracelular de *M. tuberculosis* requiere un intercambio químico entre la bacteria y la célula hospedadora (178).

Sin embargo, el análisis de la expresión génica de *M. tuberculosis* dentro del macrófago tiene como gran limitación la escasa cantidad de ARNm de la micobacteria que es posible obtener. La integridad y la cantidad del ARN son factores que afectan al análisis de los microarrays, siendo un factor crítico que ha de ser tenido en cuenta en el diseño del experimento (41). Por esta razón, la mayoría de los estudios se han centrado en analizar el perfil de expresión de la célula hospedadora en respuesta a la infección por *M. tuberculosis*, encontrándose que, entre los genes que ven modificada su expresión en el macrófago en respuesta a la infección, se encuentran principalmente genes que codifican citoquinas, quimiocinas, moléculas de señalización, proteínas de adhesión y estrés oxidativo (79, 173, 213). Algunos autores han establecido un perfil de expresión común del macrófago en respuesta a la infección por diferentes patógenos en el que también se encuentran genes implicados en las funciones anteriormente citadas (159). Este último estudio ha permitido establecer las bases de la respuesta innata desarrollada por el macrófago frente a la bacteria, aunque también se han puesto de manifiesto mecanismos de respuesta específicos frente a cada patógeno.

Junto al papel crucial que juega el macrófago en la infección por *M. tuberculosis*, las células dendríticas poseen también una gran importancia en su papel como células activadoras de los linfocitos T. Por esta razón, el perfil de expresión de estas células tras la fagocitosis de las micobacterias también ha sido analizado, demostrándose que estas células comparten la expresión de determinados genes con los macrófagos, pero que a su vez muestran un perfil de expresión característico para cada patógeno (58). Entre los genes diferencialmente expresados por macrófagos y células dendríticas en respuesta a la infección por *M. tuberculosis* se encuentran genes implicados en estrés oxidativo, acidificación de vesículas intracelulares y tráfico de moléculas (213). Además, *M. tuberculosis* también posee un perfil de expresión específico para cada tipo celular y el análisis de los genes diferencialmente expresados por la bacteria en cada una de estas células ha desvelado que en el interior de las células dendríticas está sometida a un estrés mucho mayor debido a la capacidad de estas células de impedir el crecimiento de los

patógenos en su interior. Por el contrario, el transcriptoma de la micobacteria dentro del macrófago refleja la capacidad de replicación de la bacteria dentro de estas células (213).

Junto a la tecnología de microarrays, nuevas técnicas de mutagénesis basadas en la utilización de transposones han permitido confirmar el significado fenotípico de aquellos genes diferencialmente expresados por la micobacteria identificados durante el análisis transcriptómico. Gracias a estas técnicas de mutagénesis se han generado mutantes en los genes identificados por el análisis genómico y se ha evaluado la pérdida de su fenotipo en modelos de infección (178).

OBJETIVOS GENERALES

LINEAS GENERALES DE TRABAJO

Las técnicas de genotipado han permitido ampliar el conocimiento que se tenía de la infección por *M. tuberculosis*, tanto en el contexto epidemiológico como en el clínico, desvelando aspectos interesantes relacionados con las dinámicas de transmisión, así como la existencia de una complejidad clonal mayor de la que inicialmente se asumía en cuanto a la infección por este patógeno. Asimismo, la aplicación de estas herramientas moleculares también ha permitido analizar los factores de riesgo asociados a la transmisión de *M. tuberculosis* en determinados contextos epidemiológicos e identificar determinadas cepas de *M. tuberculosis* con un interés especial, debido a su amplia distribución en la comunidad, a su elevada virulencia o a su implicación en infecciones policlonales.

Sin embargo, a pesar de la creciente implementación de estas técnicas de genotipado en los laboratorios de micobacteriología y de su introducción en muchos de los estudios de epidemiología en combinación con el estudio convencional de contactos, aún existen diversas limitaciones, tanto metodológicas como analíticas, que han de ser solventadas. En este sentido, los estudios de epidemiología molecular requieren una depuración refinada de los clusters para permitir una identificación precisa de los casos infectados por una misma cepa que se encuentran implicados en eventos de transmisión reciente. Este análisis depurado de las cadenas de transmisión conlleva: 1) la rápida identificación de falsos positivos debidos a una contaminación cruzada de laboratorio, 2) la resolución de las discrepancias existentes entre la epidemiología molecular y el estudio convencional de contactos y 3) la identificación de aquellos fenómenos de complejidad clonal que pudiesen ocasionar errores en la asignación de genotipos, que enmascaren determinados eslabones de una cadena de transmisión reciente.

La nueva herramienta de genotipado MIRU-VNTR ha demostrado ser una alternativa a la técnica de genotipado de referencia, IS6110-RFLP, debido a su sencillez, rapidez y a la baja cantidad de ADN que es requerida para la obtención de genotipos. Asimismo, posee una capacidad de discriminación semejante a la técnica de referencia y ha demostrado ser eficaz y sensible en la identificación de fenómenos de complejidad clonal. Por esta razón, hemos decidido apoyarnos en la técnica de MIRU-VNTR para desarrollar estrategias de refinamiento, tanto metodológico como analítico, dirigidas a

Objetivos generales

solventar las limitaciones que existen en los estudios de epidemiología molecular anteriormente citadas.

Por otra parte, teniendo en cuenta el interés que encierran en sí mismos los fenómenos de complejidad clonal y el escaso número de estudios que existe en torno a ellos, debido principalmente a la dificultad de su detección, en este trabajo hemos decidido desarrollar optimizaciones metodológicas y analíticas que faciliten su identificación y que permitan dimensionarlos con mayor exactitud.

Por último, la identificación de determinadas cepas con un elevado interés clínico y/o epidemiológico durante el desarrollo de esta tesis, nos ha llevado a abordar la caracterización de su virulencia, así como a tratar de identificar aquellos aspectos, de la bacteria o del hospedador, relevantes en la infección por estas cepas. De este modo, se ha analizado la infectividad de una selección de cepas de interés y, en aquellas en las que se documentó un comportamiento infectivo diferente, se ha abordado su caracterización genómica/transcriptómica con el fin de identificar las causas de esta infectividad diferencial.

OBJETIVOS

A) Objetivos relacionados con el refinamiento metodológico y analítico orientado a solventar las limitaciones que existen en el estudio de las cadenas de transmisión reciente

- **OBJETIVO 1:** Desarrollar estrategias moleculares para optimizar la resolución de contaminaciones cruzadas en los laboratorios de micobacteriología.
- **OBJETIVO 2:** Refinar el análisis de casos de tuberculosis relacionados epidemiológicamente pero no confirmados por el genotipado basado en la técnica IS6110-RFLP

B) Objetivos relacionados con el refinamiento metodológico orientado a mejorar la detección de la complejidad clonal en la infección por *M. tuberculosis*

- **OBJETIVO 3:** Desarrollar sistemas de análisis clonal rápido de los casos de tuberculosis recurrente.
- **OBJETIVO 4:** Analizar si el cultivo de las muestras clínicas puede modificar la composición clonal de *M. tuberculosis* presente en las mismas.
- **OBJETIVO 5.1:** Analizar la participación de complejidad clonal en casos considerados como reinfecciones exógenas.

C) Objetivos relacionados con la caracterización de determinadas cepas con interés clínico y/o epidemiológico

- **OBJETIVO 5.2:** Caracterizar la infectividad de cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes con reinfecciones.

Objetivos generales

- **OBJETIVO 6:** Caracterizar desde un punto de vista molecular, epidemiológico e infeccioso una cepa de *M. tuberculosis* prevalente en Madrid.
- **OBJETIVO 7:** Caracterizar mediante estrategias de genómica y transcriptómica dos variantes clonales de *M. tuberculosis* con diferente comportamiento infeccioso.
- **OBJETIVO 8:** Analizar la virulencia de una selección de cepas Beijing y caracterizar la expresión génica celular tras la infección.

METODOLOGÍA Y RESULTADOS

OBJETIVO 1:

Desarrollar estrategias moleculares para optimizar la resolución de contaminaciones cruzadas en los laboratorios de micobacteriología.

Resolución molecular optimizada de las alertas de contaminación cruzada en los laboratorios de micobacteriología clínica.

Publicado en BMC Microbiology, Febrero 2008

RESUMEN

La existencia de falsos-positivos debidos a las contaminaciones cruzadas que pueden tener lugar durante el cultivo de *M. tuberculosis* en el laboratorio es un fenómeno conocido y con un evidente impacto clínico, terapéutico y social. La confirmación final de un evento de contaminación cruzada requiere la identificación molecular de la misma cepa de *M. tuberculosis* cultivada tanto en la fuente potencial de contaminación, como en el candidato a constituir un falso-positivo. La herramienta molecular utilizada generalmente para resolver estos casos es la técnica IS6110-RFLP, que requiere largos períodos hasta la obtención de los resultados, generalmente más prolongados que el tiempo demandado por los microbiólogos y los clínicos para clarificar una sospecha de falso positivo. El objetivo de este estudio es evaluar la nueva técnica de genotipado MIRU-VNTR como alternativa para proporcionar una resolución rápida de los casos de contaminación cruzada de laboratorio.

IS6110-RFLP y MIRU-VNTR fueron comparadas prospectivamente en la resolución de 19 alertas de contaminación cruzada de laboratorio. MIRU-VNTR mostró una elevada correlación con la técnica IS6110-RFLP, redujo el tiempo de respuesta en 27 días y permitió clarificar 6 alertas que IS6110-RFLP no pudo resolver. Adicionalmente, MIRU-VNTR reveló situaciones complejas, tales como un caso de contaminación cruzada originadospor dos fuentes independientes.

Research article

Open Access

Optimized molecular resolution of cross-contamination alerts in clinical mycobacteriology laboratories

Ana Martín¹, Marta Herranz¹, Miguel Martínez Lirola²,
Rosa Fernández Fernández³, INDAL-TB group, Emilio Bouza¹ and
Darío García de Viedma*¹

Address: ¹Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas. Hospital Gregorio Marañón, Universidad Complutense, Madrid, CIBER-Enfermedades Respiratorias CIBERES, Spain, ²Servicio de Microbiología. Complejo Hospitalario Torrecárdenas, Almería, Spain and ³Unidad de Tuberculosis del Distrito Poniente, Almería, Spain

Email: Ana Martín - amartsan@yahoo.es; Marta Herranz - m_herranz01@hotmail.com; Miguel Martínez Lirola - manezlirola@ono.com; Rosa Fernández Fernández - manezlirola@ono.com; INDAL-TB group - manezlirola@ono.es; Emilio Bouza - ebouza@microb.net; Darío García de Viedma* - dgvedma@microb.net

* Corresponding author

Published: 14 February 2008

Received: 17 July 2007

BMC Microbiology 2008, 8:30 doi:10.1186/1471-2180-8-30

Accepted: 14 February 2008

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/8/30>

© 2008 Martín et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: The phenomenon of misdiagnosing tuberculosis (TB) by laboratory cross-contamination when culturing *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) has been widely reported and it has an obvious clinical, therapeutic and social impact. The final confirmation of a cross-contamination event requires the molecular identification of the same MTB strain cultured from both the potential source of the contamination and from the false-positive candidate. The molecular tool usually applied in this context is IS6110-RFLP which takes a long time to provide an answer, usually longer than is acceptable for microbiologists and clinicians to make decisions. Our purpose in this study is to evaluate a novel PCR-based method, MIRU-VNTR as an alternative to assure a rapid and optimized analysis of cross-contamination alerts.

Results: MIRU-VNTR was prospectively compared with IS6110-RFLP for clarifying 19 alerts of false positivity from other laboratories. MIRU-VNTR highly correlated with IS6110-RFLP, reduced the response time by 27 days and clarified six alerts unresolved by RFLP. Additionally, MIRU-VNTR revealed complex situations such as contamination events involving polyclonal isolates and a false-positive case due to the simultaneous cross-contamination from two independent sources.

Conclusion: Unlike standard RFLP-based genotyping, MIRU-VNTR i) could help reduce the impact of a false positive diagnosis of TB, ii) increased the number of events that could be solved and iii) revealed the complexity of some cross-contamination events that could not be dissected by IS6110-RFLP.

Background

The false diagnosis of tuberculosis (TB) due to laboratory cross-contamination is a well-known phenomenon and

has been reported to occur in 0.1–3% of cases [1-5]. It has an obvious epidemiological, clinical and therapeutical impact -each misdiagnosis of tuberculosis due to labora-

tory cross-contamination has been estimated to cost on average 10,872 dollars [6]. We recently presented data indicating that laboratory cross-contamination events are more frequent than expected [7] and that these alerts require a faster clarification. False positivity due to laboratory cross-contamination is suspected when i) *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) is cultured from only one of the serial specimens of a patient, ii) the bacterial yield in the culture is low and iii) the suspected sample has been processed together (or in a short period of time apart) with at least one other from a patient with a high bacterial load. The final confirmation of false positivity requires the application of molecular tools to prove that the MTB isolates from the co-processed specimens share identical genotypic patterns (after having ruled out epidemiological links between the cases involved). Unfortunately, the reference MTB genotyping method, IS6110-RFLP, requires well-grown cultures and takes a long time to provide an answer, usually longer than is acceptable for microbiologists and clinicians to make decisions.

A rapid PCR-based MTB genotyping tool, MIRU-VNTR (Mycobacterial-interspersed-repetitive-units-Variable-number-tandem-repeats) [8], has recently been developed and has proved useful in different epidemiological studies [9,10]. It could allow quicker resolution of cross-contamination alerts although studies evaluating the efficiency of MIRU-VNTR in this context in a prospective design are lacking, and only a few isolated examples of its potential in identifying false-positive cases have been reported [11]. Our purpose in this study is to evaluate MIRU-VNTR as an alternative to assure a rapid analysis of cross-contamination alerts in reference laboratories.

Results and Discussion

We prospectively evaluated whether MIRU-VNTR could be an alternative to RFLP for the fast resolution of laboratory cross-contamination alerts in reference genotyping centres. Therefore, we applied both IS6110-RFLP and MIRU-VNTR in a pilot study to analyze all the alerts received from laboratories in Almería, Spain. We compared the response time and the correlation between the diagnosis of either true positivity or laboratory cross-contamination using both techniques. The response time was measured from the moment the culture was received until MIRUtype for all the 12 loci assayed, or an RFLPtype were obtained. We decided to accept only those results obtained within a reasonable time frame (below 90 days), because longer times were not considered useful for resolving the alerts.

Between November 2005 and February 2007, 19 cross-contamination alerts were received in our laboratory. If the potential sources (candidates of true-positive cases) and receptors (candidates of false-positive cases) in con-

tamination events are taken together, a total of 48 cultures were involved (Figures 1 & 2). In all cases MIRU-VNTR resolved the alert before RFLP. The response time range for MIRU-VNTR from the reception of the sample was 3–28 days (median: 13 days) whereas RFLP required 24–77 days (median 45 days) (Figure 1). This means that MIRU-VNTR reduced the standard response time by 16–60 days (median: 27 days), which could easily have been increased if priority had been given to performing MIRU-VNTR analysis. Instead, we preferred to perform this evaluation in the real situation of a genotyping laboratory with many other routines. The response time for MIRU-VNTR was longer than could be expected because the primary culture had to be sent to another reference laboratory to perform susceptibility assays, and this meant the reception in many cases of fresh subcultures that required preincubation before analysis. The application of capillary electrophoresis to analyze MIRU-VNTR products [8] had also reduced the response time. With regard to the correlation in the answers, RFLP detected false-positivity in eight of the thirteen events in which it was able to provide a response, indicating that the cross-contamination alerts were justified. MIRU-VNTR, even having applied the 12-loci set which is less discriminatory than the 15 or 24-loci sets [12,13], correlated in all cases except in one alert (alert 4) considered as true positivity by RFLP whereas MIRU-VNTR found identical genotypes for the involved cases. To try to clarify this discrepancy, MIRU-VNTR with the whole set of 24 loci was applied and, again, the involved cases shared identical MIRUtypes. A detailed analysis of the RFLPtypes indicated that most of the bands in alert 4 were shared and that differences could result from the acquisition of an additional *PvuII* site responsible for the digestion of a long band into two smaller bands (Figure 1). One possible explanation for this potential discrepancy would be that the potential source case was infected by two IS6110 RFLP variants and only one was involved in the cross-contamination event. Consistent with this hypothesis, an independent specimen from the source case was genotyped and the same IS6110 profile as the one displayed in the contamination event was observed (data not shown).

As indicated above, RFLP could not offer an answer in six alerts, either because some of the cultures (in three alerts) did not lead to the bacterial yield required for RFLP or because the 90-day limit was exceeded. In all the cases that remained unsolved by RFLP, MIRU-VNTR provided a result and, in two of them, it identified a cross-contamination that would have gone undetected if only RFLP analysis had been available. Each one of these two cross-contamination events revealed only by MIRU-VNTR showed interesting features (Figure 2). The first one (alert 15) involved a polyclonal isolate, with two variants in one loci, similar to others previously reported [14]. The sec-

ALERT	VNTR-MIRU ANALYSIS			RFLP ANALYSIS			TIME DIFFERENCES
	MIRU-type	TIME	RESULT	RFLP-type	TIME	RESULT	
1	PS: 225325153323 CCA:225325153323	8	FP		51	FP	43
2	PS: 223415153323 CCA:223326153325	21	TP		48	TP	27
3	PS: 225325153323 CCA:225325153323	28	FP		49	FP	21
4	PS: 225323153423 CCA:225323153423	13	FP		29	TP	16
5	PS: 224213153323 CCA:224213153323	13	FP		29	FP	16
6	PS: 225325153323 CCA:225325153323	8	FP		51	FP	43
7	PS: 22426153313 CCA:223415153323	13	TP		29	TP	16
8	PS: 225313153323 CCA:225313153323	17	FP		77	FP	60
9	PS1: 224325154323 CCA:224325154323 PS2: 22426163321	5	FP		45	FP	40
10	PS: 323325153325 CCA:323325153325	3	FP		24	FP	21
11	PS: 126325153324 CCA:126325153324	11	FP		62	FP	51
12	PS: 224325163221 CCA:225325154324	13	TP		29	TP	16
13	PS1: 224325154323 CCA:224325154323 PS2: 22426163321	5	FP		45	FP	40

Figure 1

The numbers for each alert were assigned chronologically. For each alert the potential source/s (PS) and the cross-contamination alerts (CCA) are indicated. The MIRUtypes and RFLPtypes and the time (days) for the obtention of results, the result (TP: True positivity, FP: False positivity) after analyzing the MIRU-VNTR and RFLP fingerprints, and the differences between the time for solving the alerts by MIRU-VNTR and RFLP are shown. The asterisks in alert 4 indicate the differential bands between the RFLP patterns. The MIRU-VNTR alleles which are different for the isolates from an alert are highlighted in bold.

ond (alert 19) was a complex situation in which two cross-contamination events occurred simultaneously. Each of two different sources (PS1 and PS2) contaminated a specimen from two independent patients (CCA1 and CCA2) and both (PS1 and PS2) were also involved in the simultaneous contamination of an additional specimen from another case (CCA3). This double contaminated case (CCA3) could be detected by MIRU-VNTR because its pattern was the combination of the MIRUtypes of the sources (PS1 and PS2), with two different alleles in three of the loci (Figure 2). In this alert, the 90-day limit was exceeded by RFLP and the profiles are not shown; however, the complex patterns of the isolates involved (14 bands and 8 bands) led to a 22-band pattern in the double-contaminated false-positive case that prevented identification of false-positivity by RFLP but not by MIRU-VNTR.

Conclusion

Our data mean that MIRU-VNTR is more adequate than RFLP for analyzing cross-contamination alerts. It was

faster than RFLP, the correlation with RFLP diagnosis was high and it succeeded in resolving alerts even under circumstances that were not appropriate for the RFLP analysis requirements. A permanently suspicious attitude on the part of the clinical mycobacteriologist together with access to a fast resolution of cross-contamination alerts could enable more rapid management of suspected false-positive cases, because culture-results would only need to be retained for a short time before clarification. Unlike standard RFLP-based genotyping, MIRU-VNTR could help reduce the impact of a false positive diagnosis of TB.

Methods

Samples

Clinical specimens were processed according to standard methods and grown in Lowenstein-Jensen slants and in MGIT (Becton Dickinson, Sparks, Md) liquid media.

Analysis of the cross-contamination alerts by MIRU-VNTR and RFLP

ALERT	VNTR-MIRU ANALYSIS	
	MIRU-type	RESULT
14	CCA:333315153222 PS: 22__2_153324	TP
15	CCA: 224226163₂³21 PS: 224226163₂³21	FP
16	CCA: 225313153321 PS1: 22__25163324 PS2: 224326133324	TP
17	CCA:223_25153322 PS1: 2434_42532_2 PS2: 22635_1533_3 PS3: 224226163₂³21	TP
18	CCA:225326133324 PS: 224213153323	TP
19	PS1: 225325153323 CCA1:225325153323 CCA3: 22₅²2₆²1₅⁴332₃¹ CCA2:223226143321 PS2: 223226143321	FP

Figure 2

Analysis by MIRU-VNTR of the cross-contamination alerts that could not be solved by RFLP. The numbers for each alert were assigned chronologically. For each alert the potential source/s (PS) and the cross-contamination alerts (CCA) are indicated. The MIRUtypes and the results (TP: True positivity, FP: False positivity) after analyzing the MIRU-VNTR fingerprints are shown. The MIRU-VNTR alleles which are different for the isolates from an alert are highlighted in bold. The loci which appear underscored mean that no amplification product was obtained. The loci with two values indicate that two alleles were simultaneously detected for that locus.

Molecular analysis

For IS6110-RFLP we followed the standard procedures [15], and for MIRU-VNTR we applied the 12-loci set [8], trying to apply the simplest and fastest MIRU format and also attempting to obtain a result by directly amplifying a crude extract of the culture (after boiling and sonicating for ten and five minutes, respectively). MIRU-VNTR products were separated by electrophoresis at 45 V for 17 h 30 min, using MSS 2% agarose gels (Pronadisa, Madrid, Spain). Fragment sizes were calculated with the Chemi-Doc system (BioRad, CA, USA) and the Diversity database (BioRad), using a 100-bp ladder (Invitrogen, CA, USA) as a molecular weight marker. The number of repeats in each

locus was calculated by applying the corresponding conversion tables (P. Supply, personal communication)

Molecular patterns were analyzed using Bionumerics 4.6 (Applied Maths, Sint-Martens Laten, Belgium). Results were interpreted as false positivity if both the potential source and the cross-contamination alert had identical MIRU-VNTR and IS6110 RFLP and the converse for true positivity.

Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AM performed all the VNTR-MIRU assays, analyzed the results and was involved in the first version of the MS. MH performed the IS6110-RFLP assays, analyzed the results and was involved in the first version of the MS. MML performed all the microbiological procedures and identified the cross-contamination alerts. He has been involved in the compilation of all microbiological and clinical data essential for the analysis of the alerts. RFI was involved in the analysis of all the clinical and epidemiological data required for the analysis of the alerts. EB revised critically the final version of the MS. DGV* designed the study, supervised all experimental work, analyzed the results, corrected and produced the final version of the MS. INDAL-TB group was involved in the compilation and analysis of microbiological, clinical and epidemiological data relevant for the analysis of the cross-contamination alerts and critically reviewed the final version of the MS. All the authors read and approved the final MS.

Acknowledgements

We are indebted to Thomas O'Boyle for proofreading and editing the manuscript.

This study was partially financed by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS030654; FIS030986; FIS060882; FIS061467; 06/90490; 06/90357), Junta de Andalucía (0453/06, 151/05) and by the Instituto de Salud Carlos III (CIBER Enfermedades Respiratorias CB06/06/0058). A.M is receptor of a grant from Comunidad de Madrid cofinanced by the European Social Fund (Order no 5297/2006). INDAL-TB group: MI Sánchez, MC Rogado, T Cabezas, W Sánchez-Yebra, J Martínez, MA Lucerna, P Barroso, I Cabeza-Barrera, LF Díez, M Rodríguez, M Escámez, P Marín, A Lazo, J Gamir, J Vázquez, C Gutiérrez, A Reyes and T Peñafiel.

References

- 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(11):4100-4104.
- Small PM, McClenny NB, Singh SP, Schoolnik GK, Tompkins LS, Mickelsen PA: **Molecular strain typing of Mycobacterium tuberculosis to confirm cross-contamination in the mycobacteriology laboratory and modification of procedures to minimize occurrence of false-positive cultures.** *J Clin Microbiol* 1993, 31(7):1677-1682.

3. Multiple misdiagnoses of tuberculosis resulting from laboratory error--Wisconsin, 1996. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997, **46**(34):797-801.
4. de Boer AS, Blommerde B, de Haas PE, Sebek MM, Lambregts-van Weezenbeek KS, Dessens M, van Soolingen D: False-positive mycobacterium tuberculosis cultures in 44 laboratories in The Netherlands (1993 to 2000): incidence, risk factors, and consequences. *J Clin Microbiol* 2002, **40**(11):4004-4009.
5. de C Ramos M, Soini H, Roscanni GC, Jaques M, Villares MC, Musser JM: Extensive cross-contamination of specimens with *Mycobacterium tuberculosis* in a reference laboratory. *J Clin Microbiol* 1999, **37**(4):916-919.
6. Northrup JM, Miller AC, Nardell E, Sharnprapai S, Etkind S, Driscoll J, McGarry M, Taber HW, Elvin P, Qualls NL, Braden CR: Estimated costs of false laboratory diagnoses of tuberculosis in three patients. *Emerg Infect Dis* 2002, **8**(11):1264-1270.
7. Martínez M, García de Viedma D, Alonso M, Andrés S, Bouza E, Cabezas T, Cabeza I, Reyes A, Sánchez-Yebra W, Rodríguez M, Sánchez MI, Rogado MC, Fernández R, Penafiel T, Martínez J, Barroso P, Lucerna MA, Díez LF, Gutiérrez C: Impact of laboratory cross-contamination on molecular epidemiology studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2006, **44**(8):2967-2969.
8. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C: Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 2001, **39**(10):3563-3571.
9. Blackwood KS, Wolfe JN, Kabani AM: Application of mycobacterial interspersed repetitive unit typing to *Manitoba tuberculosis* cases: can restriction fragment length polymorphism be forgotten? *J Clin Microbiol* 2004, **42**(11):5001-5006.
10. Hawkey PM, Smith EG, Evans JT, Monk P, Bryan G, Mohamed HH, Bardhan M, Pugh RN: Mycobacterial interspersed repetitive unit typing of *Mycobacterium tuberculosis* compared to IS6110-based restriction fragment length polymorphism analysis for investigation of apparently clustered cases of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2003, **41**(8):3514-3520.
11. 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**(6):783-789.
12. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutiérrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, 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**(12):4498-4510.
13. Oelemann MC, Diel R, Vatin V, Haas W, Rusch-Gerdes S, Locht C, Niemann S, Supply P: Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2007, **45**(3):691-697.
14. Shampua IC, Jugheli L, Sadradze N, Willery E, Portaels F, Supply P, Rigouts L: Mixed infection and clonal representativeness of a single sputum sample in tuberculosis patients from a penitentiary hospital in Georgia. *Respir Res* 2006, **7**:99.
15. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM, et al.: Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993, **31**(2):406-409.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



OBJETIVO 2:

Refinar el análisis de casos de tuberculosis relacionados epidemiológicamente pero no confirmados por el genotipado basado en la técnica IS6110-RFLP

Reanálisis de casos de tuberculosis relacionados epidemiológicamente no confirmados por el genotipado basado en la técnica IS6110-RFLP.

Publicado en *Clinical Microbiology and Infection*, Agosto 2009

RESUMEN

Una microepidemia de tuberculosis se define cuando existe un nexo epidemiológico probado entre un número reducido de casos de tuberculosis. Sin embargo, algunos estudios han encontrado microepidemias que no están confirmadas por las técnicas de genotipado.

Se analizaron 77 casos de tuberculosis, pertenecientes a 33 microepidemias, probadas epidemiológicamente, identificadas durante un período de 5 años en Madrid, con el fin de comprobar si eran confirmadas por el análisis molecular realizado con la técnica IS6110-RFLP. Doce parejas (27.3%) no fueron confirmadas inicialmente por el tipado molecular y se realizó un re-análisis refinado para esclarecer las razones de dichas discrepancias. Las posibles causas que se consideraron para explicar estas discrepancias fueron: i) posibles errores de laboratorio o eventos de contaminación cruzada de laboratorio, ii) infecciones clonalmente complejas no detectadas, y iii) falta de refinamiento en el análisis genotípico que pudiera quedar resuelto mediante la aplicación de técnicas de genotipado en segunda línea. Una de las discrepancias fue debida a un error de laboratorio. No se encontró ninguna microepidemia que fuera discrepante como resultado de una asignación incorrecta de genotipos causada por una infección policlonal. La aplicación conjunta de Spoligotipado, MIRU15 y IS6110-RFLP permitió la identificación de genotipos compartidos en 4 de las microepidemias inicialmente consideradas discrepantes, reduciendo el porcentaje de discrepancias de un 27.3% a un 15.9% (7/44). Sin embargo, en las siete microepidemias restantes el genotipado de segunda línea identificó diferencias apoyadas, al menos, en dos de las tres técnicas aplicadas.

Estos hallazgos alertan de la necesidad de i) refinar al máximo el análisis molecular para identificar de una manera más precisa aquellas microepidemias que son

realmente discrepantes con los datos genotípicos, y ii) ampliar la búsqueda de entornos de transmisión más allá de los contextos convencionales.

Re-analysis of epidemiologically linked tuberculosis cases not supported by IS6110-RFLP-based genotyping

A. Martín¹, J. Iñigo³, F. Chaves⁴, M. Herranz^{1,2}, M. J. Ruiz-Serrano^{1,2}, E. Palenque⁴, E. Bouza^{1,2} and D. García de Viedma^{1,2}

1) Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas, Hospital Gregorio Marañón, Madrid, 2) CIBER Enfermedades Respiratorias-CIBERES,

3) Consejería de Sanidad Comunidad de Madrid and 4) Servicio de Microbiología, Hospital Doce de Octubre, Madrid, Spain

Abstract

Tuberculosis microepidemics are considered as such when a proven epidemiological link is identified between the cases. However, some studies have found microepidemics that were not supported by genotyping data. In a cross-sectional study, 44 linked pairs from 33 microepidemics identified during a 5-year period in Madrid, Spain were analysed to evaluate whether the epidemiological findings were consistent with the molecular analysis by IS6110-RFLP. Twelve pairs (27.3%) were not initially confirmed by molecular typing, and a refined re-analysis was performed to identify the reasons for the discrepancies. The possible causes were as follows: (i) laboratory errors or cross-contamination events, (ii) undetected clonally complex infections, and (iii) lack of refinement in the genotyping analysis that could be clarified by applying second-line fingerprinting tools. One discrepant pair was caused by laboratory error. No discrepant pairs were the result of incorrect assignment of genotypes due to clonally complex infections. The application of spoligotyping, MIRU-15 and RFLP enabled the establishment of matching shared genotypes in four linked pairs initially considered as discrepant; therefore, the percentage of discrepant pairs was reduced from 27.3% to 15.9% (7/44). However, in the remaining seven pairs, second-line fingerprinting identified differences with at least two of the three genotyping tools applied. This finding alerts us to the need to (i) refine as much as possible the molecular analysis to establish more accurate identification of truly discrepant cases, and (ii) broaden the search for epidemiological links to include non-conventional contexts outside the household or work/school settings.

Keywords: Discrepancies, Microepidemics, molecular epidemiology, tuberculosis

Original Submission: 22 December 2008; **Accepted:** 30 January 2009

Editor: M. Drancourt

Clin Microbiol Infect

Corresponding author and reprint requests: D. García de Viedma, Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas, Hospital Gregorio Marañón, C/Dr Esquerdo, 46, 28007 Madrid, Spain
E-mail: dgvedma2@gmail.com

Introduction

Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) isolates using restriction fragment length polymorphism (RFLP) with the insertion sequence IS6110 is the standard molecular approach to analysing tuberculosis (TB) outbreaks, [1–3] recent transmission patterns [4], and prevalent circulating MTB strains [5]. In general, MTB isolates from epidemiologically linked cases share identical RFLP patterns, and are considered to be the result of recently transmitted infections.

However, the application of molecular techniques in population studies has produced paradoxical observations. First,

some authors have observed that clustering of TB cases may not always be the result of recently transmitted infection and identical DNA fingerprints can be found among patients who have never been in contact [6,7]. Others, however, suggest that in the vast majority (86%) of patients, clustering indeed represents recent transmission [8]. Second, in studies that have tested the assumption that TB in a secondary case is the result of transmission from the corresponding source case, DNA fingerprinting has shown that in up to 30% of pairs the genotypic patterns for the MTB isolates from the source and secondary cases are different [9,10].

The present study analyses the microepidemics (defined as the existence of one or more secondary cases arising from the defined index case) detected in the south of Madrid over a 5-year period. We evaluated the correlation between epidemiological and molecular data to identify discrepant pairs, which were then studied in depth to clarify the reasons for the discrepancies by refining the fingerprinting methods and strategies.

Materials and Methods

Study design and population

This cross-sectional population-based study of culture-positive TB patients was conducted in nine urban districts in the south of Madrid (Spain). The total population of almost 1.5 million inhabitants receives specialized care at Hospital 12 de Octubre and Hospital Gregorio Marañón.

The target population consisted of all residents diagnosed with TB from January 2002 to December 2006. Collaborative surveillance was carried out by two mycobacterial laboratories that were integrated into the TB control programme, together with other hospital medical departments, public health services, and primary health care.

Sociodemographic and clinical data were obtained from the Regional Tuberculosis Case Register using a standardized protocol. Data were recorded on patient characteristics (age, sex, country of origin, number of years of residence in Madrid or elsewhere in Spain, and district of residence), clinical characteristics (date of onset of symptoms, date of diagnosis, site of disease, and previous TB), risk factors for TB (homelessness, injection drug use, presence of HIV infection, previous imprisonment, diabetes, silicosis, gastrectomy, and malignant neoplasm), and information from follow-up and contact investigations.

The study was approved by the hospital ethics committee.

Definition of microepidemic

We considered an outbreak or microepidemic as the existence of one or more secondary cases arising from the same source over a 1-year period after the index case was diagnosed [11]. We preferred the term microepidemic because most of the clusters we studied included two to three cases and transmission occurred mainly between household members.

In all cases, the likelihood of transmission was classified as 'definite' because patients were found to be in the same place at the same time, when one was infectious or a patient identified another patient as being the source of TB. This classification was made by epidemiologists before the molecular study was carried out.

We used the definition of epidemiologically linked case pairs reported by Bennett *et al.* [10].

DNA fingerprinting

DNA extraction, IS6110-RFLP typing, and spoligotyping were performed according to standard methods [12,13]. Mycobacterial interspersed repetitive units-variable number of tandem repeats (MIRU-VNTR) was performed by amplifying the 15 MIRU-VNTR loci as described elsewhere [14].

Pairs were classified as infected by the same strain if (i) their IS6110 patterns had more than five bands and were identical or (ii) their IS6110 patterns had five or fewer bands of identical sizes and also shared identical spoligotypes. RFLP patterns were compared by computer-assisted analysis (Bio-numerics 5.1 software; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). For the pairs that did not fit the previous criteria, we applied a second-line typing approach based on spoligotyping and VNTR-MIRU with the set of 15 loci [15]. For these discrepant case pairs, we also analysed, when available, more than one sample from each patient.

The second-line genotyping analysis of the pairs showing differences in their RFLP types was used to classify them as follows: (i) matched pairs, if they shared both spoligotypes and MIRU types; (ii) unmatched pairs, if they showed differences both in spoligotypes and MIRU types; and (iii) partially unmatched pairs, if they showed differences either in spoligotypes or MIRU types.

Spoligotypes were considered as shared if they were identical and no variations were tolerated because of the low discriminatory power of this technique. MIRU types were considered shared if they were identical, but an allelic variation of one repetition in a single locus was tolerated.

Molecular strategy to analyse discrepant microepidemics

For the microepidemics with molecular discrepancies, we evaluated different possibilities: (i) false unclustering of the cases by involvement of some laboratory cross-contamination event or laboratory error; (ii) unclustering in the cases involved in the microepidemic caused by incorrect assignment of genotypes, due to clonally complex infections (mixed or compartmentalized infections); and (iii) lack of accuracy in the genotyping analysis that could be clarified by applying second-line fingerprinting tools, and which may have considered pairs with a similar but not identical genotype as unclustered cases.

Results

During the study period, 1768 TB cases were diagnosed, of which 1333 had a positive culture for MTB. Among the culture-positive cases, 956 isolates were available for genotyping. The study population with molecular data available did not differ with regard to clinical or demographic characteristics from the total number of culture-positive cases, with the exception that a greater proportion of isolates from immigrants was available for genotyping (36.6% vs. 30.8%; $p = 0.04$). Three hundred and thirty-one cases (34.6%) were grouped in 91 clusters involving between two and 20

patients. During this period, 33 epidemiologically proven microepidemics were detected. These involved 44 linked case pairs ranging from one to three linked pairs per microepidemic and including a total of 77 cases. In 29 pairs (65.9%), the contact occurred in the same household; the remaining linked pairs corresponded to family links (nine pairs), friends (four pairs), occupational contact (one pair), homeless sharing a shelter (one pair).

When we compared the epidemiological and molecular findings, we found that 32 linked pairs (72.7%) were initially confirmed by the molecular analysis (Fig. 1). The remaining 12 (27.3%) case pairs were not initially confirmed by RFLP-based molecular typing and eight of these (75%) were household contacts (Fig. 2).

We decided to analyse in more detail the subset of microepidemics that did not correlate with the fingerprinting data. The analysis of additional samples allowed us to identify genotyping matches in one of the pairs initially considered as discrepant. The analysis in pair 500-a of an additional sample

from case 500-3 allowed us to detect the same isolate that was involved in the infection of the related case (Fig. 2a). The genotype that had been assigned to patient 500-3 was shared with another case whose sample had been processed in the laboratory on the same day, suggesting an incorrect assignment of a specimen from the other patient.

In order to examine clonal complexity as a cause of discrepancies in some microepidemics, we searched for potential errors in the assignment of RFLP types due to mixed infections by more than one MTB strain in the same sputum sample or with different strains isolated in independent samples from a single patient. The first possibility could be explored by the application of MIRU-VNTR, which enables us to reveal clonal complexity in a sample. A sample with two clonal variants was detected (5112; Fig. 2d) in only one microepidemic, and the differences between the variants were so subtle that they were not expected to be responsible for the discrepancies in this microepidemic. As for the second possibility—different strains/clonal variants in

Microepidemic	N	RFLP band-pattern
140	2	
155	2	
158	3	
161	2	
148	3	
147	4	
128	2	
151	2	
160	2	
1167	2	
139	2	
157	2	
149	3	
5102	2	
1182	2	
1172	3	
1171	4	
1163	2	
156	2	
138	2	
1161	2	
5122-b	2	
152-b	2	
500-b	2	

FIG. 1 Microepidemics showing cases matched using molecular techniques. N, number of cases involved in each microepidemic; RFLP, restriction fragment length polymorphism.

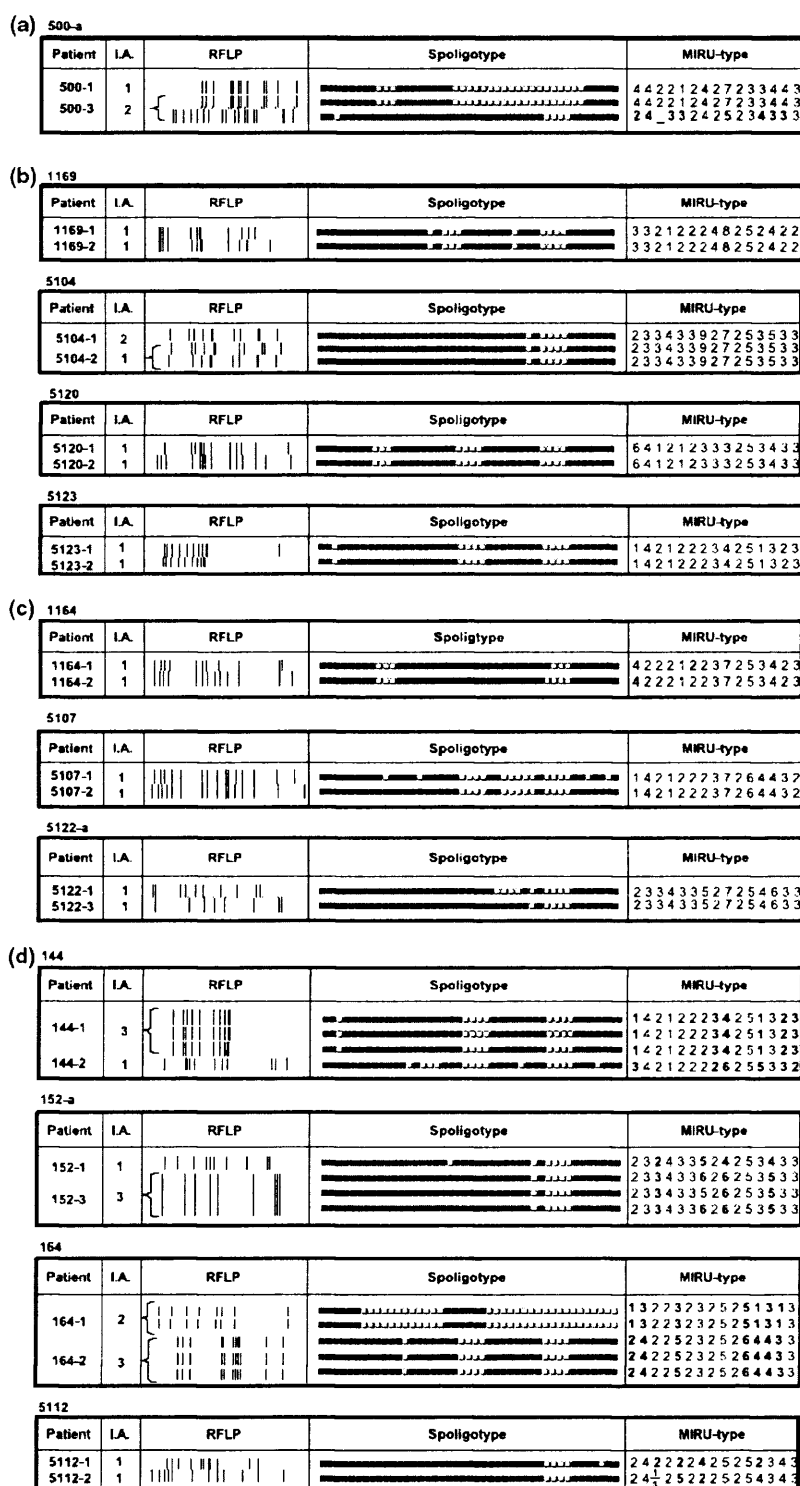


FIG. 2 Linked pairs initially considered not supported by the molecular analysis. The figure shows the number identifying each linked pair, the patients involved, the number of isolates available (I.A.) for analysis from independent specimens, the restriction fragment length polymorphism (RFLP), spoligotype, and the Mycobacterial interspersed repetitive unit (MIRU) patterns. MIRU alleles with differences between the cases involved are highlighted in bold. For case 5112-2, who was infected with two clonal variants, both alleles are shown. Pairs are grouped as follows according to the redistribution in different interpretation categories after the refined molecular re-analysis: (a) proved linked pairs after identifying a laboratory error, (b) proved linked pairs for which a molecular match had been established after second-line genotyping, (c) pairs with partial molecular differences in second-line genotyping, and (d) pairs with marked molecular differences in second-line genotyping.

different samples—we found more than one sample for analysis in only four microepidemics. We detected two clonal variants (identified by MIRU) in only one case (152-3; Fig. 2d), each in independent samples. Again, the differences between the two variants were so subtle that they were not expected to be responsible for the discrepancies in this microepidemic.

For the remaining 11 pairs that had not been clarified after consideration of laboratory errors or clonal complexity, we refined the genotyping analysis by applying a second-line approach. This allowed us to classify the pairs in three different interpretation categories:

- 1) Matched pairs: four pairs that shared spoligotypes and MIRU types (1169, 5104, 5120, 5123; Fig. 2b) and that had shown RFLP types differing in only one or two bands (except for 5120).
- 2) Partially unmatched pairs: three linked pairs sharing MIRU types but no spoligotypes (1164, 5107, 5122-a; Fig. 2c) and that had shown RFLP types differing in more than two bands.
- 3) Unmatched pairs: four pairs with differences both by spoligotyping and MIRU typing (144, 152-a, 164, 5112; Fig. 2d) and that had shown RFLP types differing in more than two bands.

A review of the epidemiological links supporting the definition of these microepidemics showed that they were defi-

nite. Only in one pair (164, which had shown marked molecular differences) were we able to identify a possible weakness in the assignment, because the patients were homeless.

The results of our refined re-analysis are summarized in Fig. 3. These results enabled us to reinterpret five of the 12 linked pairs analysed, which increased the percentage of pairs that were confirmed by molecular techniques from 72.7% to 84.1%. One pair was confirmed after identification of a laboratory error. Four pairs could have been considered concordant if spoligotyping and MIRU-15 had been applied or if minor differences between the RFLP patterns had been tolerated. Four pairs were confirmed as unrelated. For the remaining three discrepant linked pairs, one of the second-line genotyping techniques identified shared genotypes, whereas the other found differences between them.

Discussion

Microepidemics are generally defined using standard epidemiological surveys and involve cases with definite links, mostly in a household context. The introduction of molecular analysis into the study of TB transmission dynamics has revealed that a proportion of these theoretically linked cases are not supported by fingerprinting [9,10].

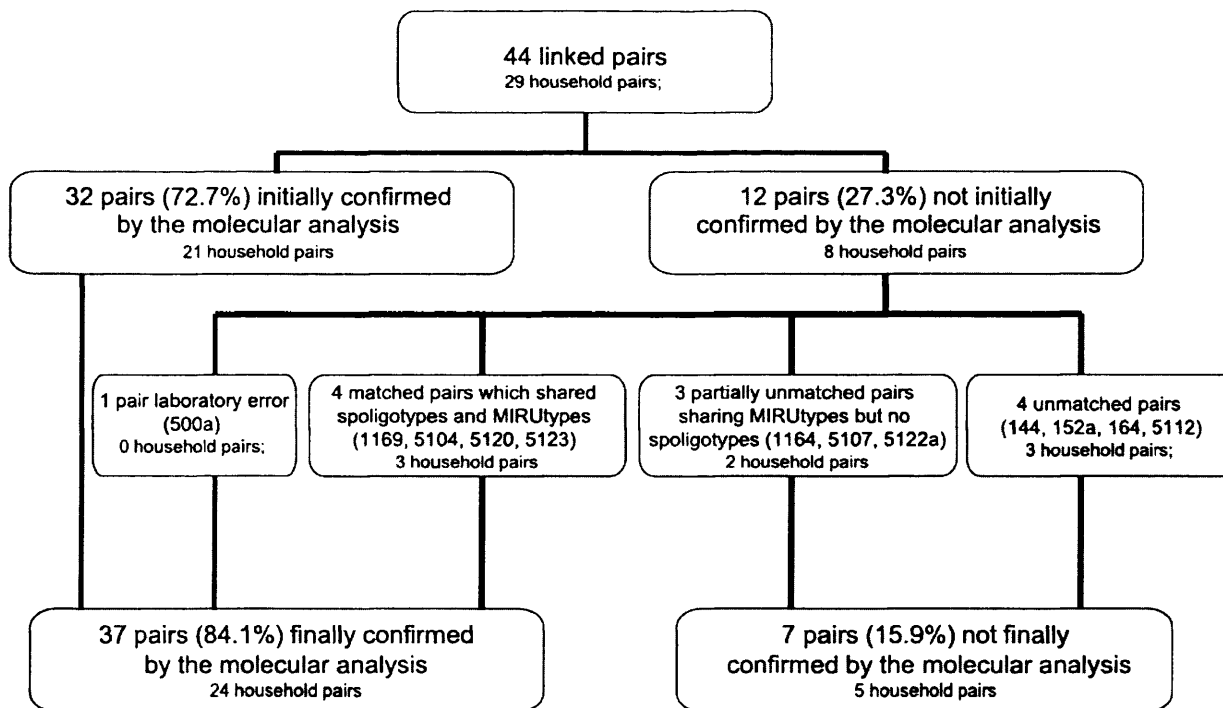


FIG. 3 Summary of the re-analysis of the 44 pairs initially considered discrepant using molecular data. From the total number of pairs in each panel, the number of pairs that involved household contacts is also indicated.

Rapid genotyping methods are available in certain centres as first-line approaches for molecular epidemiology purposes; however, studies using these techniques are scarce and RFLP is still the method most commonly used worldwide for the analysis of TB microepidemics. Considering this, we also followed the standard scheme of applying RFLP as the reference genotyping method, and MIRU-15 and spoligotype were used as second-line methods to clarify discrepancies.

We studied the proportion of microepidemics without fingerprint matches during a 5-year period in Madrid and refined the molecular analysis to evaluate the robustness of these discrepancies. Initially, we identified 12 of 44 epidemiologically linked pairs (27.3%) with discrepancies at the molecular level. After re-analysis, five of the 12 pairs (41.7%) initially considered not to be supported by genotyping were finally considered matched, thus reducing the percentage of discrepant pairs to 15.9% (7/44). However, for these remaining seven pairs, we still found genotyping differences when one or even two of the second-line genotyping tools were applied.

At first, we suspected laboratory cross-contamination [16] or errors in the assignment of some samples as causes of the discrepancies. After this analysis, one of the 12 pairs (8.3%) initially considered to be discrepant was revealed to be concordant after an unnoticed incorrect assignment of samples from two patients was identified in the laboratory.

Mixed infections by more than one strain, and compartmentalization of the infection with different strains infecting different tissues have been reported [17]. We took advantage of MIRU's ability to identify clonally complex infections directly [18], which is not easy with RFLP or spoligotyping. This analysis revealed no microepidemics in which the discrepancies could be explained by clonally complex infections.

To determine the robustness of the discrepancies in the 12 pairs that had not yet been clarified, we applied a second-line genotyping strategy based on spoligotyping and MIRU-VNTR. MIRU-15 has proven to be as discriminative as RFLP [14] and to have a good fit with the epidemiological data [19].

After our refined analysis of the discrepancies, we found that a proportion (five of the 12 linked pairs) of the microepidemics that had initially been considered not to match the molecular data could be solved and were finally shown to be matched pairs. Nevertheless, in one of these pairs (5/20), matching by spoligotyping and MIRU showed differences in more than two RFLP bands, thus suggesting some potentially unexpected rearrangements within the microepidemic only revealed by this technique. Similar results from other authors might suggest the application of an excessively strict criterion that assumed as clustered only those cases infected by MTB isolates sharing identical RFLP patterns. Subtle genetic changes can arise from the adaptation of a

strain to the different hosts in a transmission chain [20], with the result that strains showing subtle variations might be considered clustered [21].

Although the percentage of linked pairs with no molecular evidence fell from 27.3% to 15.9%, it is interesting to examine the remaining seven pairs with molecular differences in the second-line genotyping scheme. Four of these pairs had molecular mismatches by the two second-line genotyping tools and three pairs had differences by only one of them. We could only posit links other than those expected in one pair, as the cases involved were homeless people; for the remaining cases, the epidemiological survey established a definite link, and in five of these seven pairs not supported by genotyping the theoretical contact was in the household.

If the MIRU data had been the only data available, a higher number of the epidemiologically linked pairs would have been found to be consistent with the epidemiological data (8/12, 66.7%). Discrepancies between the information obtained by RFLP and MIRU have also been found in molecular epidemiology studies [15,19,22]. In some of these studies, MIRU-15-defined clusters fit better with the epidemiological data than RFLP-defined ones [19,22]. Our findings in the present study provide additional examples of circumstances where MIRU-15 data could fit better with epidemiological findings.

Other studies had already examined epidemiologically linked cases with no molecular matches, although the more detailed methodological and microbiological approach of our method allowed us to reduce the percentage of true discrepancies. In an extensive US study [10] covering seven sentinel areas over 5 years, 29% of the epidemiologically linked cases did not share matching genotypes. Discrepant microepidemics were also found for the theoretically linked cases in circumstances where the certainty of links is expected to be highest.

The existence of microepidemics not supported by molecular matches could be because TB in the secondary cases is a reactivation of an infection acquired in the past or a recent infection from another unknown source case. In our study, there was no evidence of previous TB in any of the cases involved in the microepidemics not supported by the molecular analysis. Transmission in contexts outside the household has been described, mainly in high-incidence settings [23]. Casual contacts and transmissions in non-conventional settings have been observed and are mainly revealed by universal molecular strategies and in novel epidemiological surveys based on social networks [24,25] or reinterviewing of clustered cases [26].

In summary, our study has succeeded in establishing a molecular match for epidemiologically linked pairs that were not initially supported by fingerprinting, and this allowed us to reduce the percentage of discrepant pairs from 27.3% to 15.9%. Nevertheless, seven pairs were still found to be

mismatched after the refined re-analysis. Our findings should alert us to the need to (i) refine the molecular analysis as much as possible to identify those case pairs whose molecular data truly differed from the epidemiological data, and (ii) broaden the search for epidemiological links including non-conventional contexts outside the household or work/school settings in order to increase the correlation between epidemiology and molecular analysis.

Acknowledgements

We are indebted to T. O'Boyle for proofreading and editing the manuscript.

Transparency Declaration

This study was partially financed by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 02/0572, 02/1307, 02/0882, 030654; 060882) and by Instituto de Salud Carlos III (CIBER Enfermedades Respiratorias CB06/06/0058; Spanish Network for the Research in Infectious Diseases REIPI RD06/0008). A.M. is the recipient of a grant from the Comunidad de Madrid, co-financed by the European Social Fund (Order no. 5297/2006). None of the authors declares conflicts of interest.

References

- Curtis AB, Ridzon R, Novick LF et al. Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* transmission patterns in a homeless shelter outbreak. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4: 308-313.
- McElroy PD, Sterling TR, Driver CR et al. Use of DNA fingerprinting to investigate a multiyear, multistate tuberculosis outbreak. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 1252-1256.
- Valway SE, Sanchez MP, Shinnick TF et al. An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *N Engl J Med* 1998; 5: 338.
- Inigo J, Garcia de Viedma D, Arce A et al. Analysis of changes in recent tuberculosis transmission patterns after a sharp increase in immigration. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 63-69.
- Martin A, Chaves F, Inigo J et al. Molecular, epidemiological and infectivity characterisation of a *Mycobacterium tuberculosis* strain prevalent in Madrid. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 1210-1213.
- Hermans PW, Messadi F, Guebrevabher H et al. Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia, and the Netherlands: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. *J Infect Dis* 1995; 171: 1504-1513.
- Braden CR, Templeton GL, Cave MD et al. Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a state with a large rural population. *J Infect Dis* 1997; 175: 1446-1452.
- van Deutekom H, Hoiyng SP, de Haas PE et al. Clustered tuberculosis cases: do they represent recent transmission and can they be detected earlier? *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 806-810.
- Behr MA, Hopewell PC, Paz EA, Kawamura LM, Schecter GF, Small PM. Predictive value of contact investigation for identifying recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 465-469.
- Bennett DE, Onorato IM, Ellis BA et al. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from epidemiologically linked case pairs. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 1224-1229.
- Centro Nacional de Epidemiología. Protocolos de las enfermedades de declaración obligatoria.
- van Embden JD, Cave MD, Crawford JT et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 406-409.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 907-914.
- Supply P, Allix C, Lesjean S et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4498-4510.
- Oelemann MC, Diel R, Vatin V et al. Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 691-697.
- Martinez M, Garcia deViedma D, Alonso M et al. Impact of laboratory cross-contamination on molecular epidemiology studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2967-2969.
- Garcia deViedma D, Marin M, Ruiz Serrano MJ, Alcalá L, Bouza E. Polyclonal and compartmentalized infection by *Mycobacterium tuberculosis* in patients with both respiratory and extrapulmonary involvement. *J Infect Dis* 2003; 15: 187.
- Garcia deViedma D, Alonso Rodriguez N, Andres S, Ruiz Serrano MJ, Bouza E. Characterization of clonal complexity in tuberculosis by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5660-5664.
- Alonso-Rodriguez N, Martinez-Lirola M, Herranz M et al. Evaluation of the new advanced 15-loci MIRU-VNTR genotyping tool in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology studies. *BMC Microbiol* 2008; 8: 34.
- Glynn JR, Yates MD, Crampin AC et al. DNA fingerprint changes in tuberculosis: reinfection, evolution, or laboratory error? *J Infect Dis* 2004; 15: 190.
- Cave MD, Yang ZH, Stefanova R et al. Epidemiologic import of tuberculosis cases whose isolates have similar but not identical IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1228-1233.
- Allix-Beguec C, Fauville-Dufaux M, Supply P. Three-year population-based evaluation of standardized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1398-1406.
- Verver S, Warren RM, Munch Z et al. Proportion of tuberculosis transmission that takes place in households in a high-incidence area. *Lancet* 2004; 364: 212-214.
- Nakamura Y, Obase Y, Suyama N et al. A small outbreak of pulmonary tuberculosis in non-close contact patrons of a bar. *Intern Med* 2004; 43: 263-267.
- Bock NN, Mallory JP, Mobley N, DeVoe B, Taylor BB. Outbreak of tuberculosis associated with a floating card game in the rural south: lessons for tuberculosis contact investigations. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 1221-1226.
- Martinez-Lirola M, Alonso-Rodriguez N, Sanchez ML et al. Advanced survey of tuberculosis transmission in a complex socioepidemiologic scenario with a high proportion of cases in immigrants. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 8-14.

OBJETIVO 3:

Desarrollar sistemas de análisis clonal rápido de los casos de tuberculosis recurrente.

Análisis clonal rápido de casos de tuberculosis recurrente mediante análisis por MIRU-VNTR directamente sobre aislados clínicos archivados.

Publicado en BMC Microbiology, Julio 2007.

RESUMEN

La aplicación de las herramientas moleculares al estudio de la tuberculosis ha revelado ejemplos de complejidad clonal, tales como reinfección exógena, coinfección, microevolución o compartimentalización. La detección de complejidad clonal mediante las aproximaciones de genotipado estándar es laboriosa y, a menudo, requiere la participación de personal experto, lo que limita la disponibilidad rápida de genotipos de *M. tuberculosis* a la hora de caracterizar recurrencias. MIRU-VNTR, una nueva técnica de genotipado basada en PCR, ha hecho posible la obtención de genotipos de *M. tuberculosis* en un marco de tiempo más próximo al diagnóstico y ha demostrado su utilidad en la identificación rápida y sencilla de fenómenos de complejidad clonal. El objetivo de este estudio fue analizar la capacidad de la técnica MIRU-VNTR para proporcionar al clínico una rápida discriminación entre los fenómenos de reactivación y reinfección exógena y, asimismo, valorar si esta técnica ofrece la sensibilidad suficiente en la obtención de genotipos directamente de aislados de *M. tuberculosis* archivados, sin necesidad de subcultivar ni purificar el ADN.

Se analizaron por MIRU-VNTR 32 aislados archivados pertenecientes a 13 pacientes con tuberculosis recurrente, detectándose diferencias entre los MIRU-tipos de los aislados recurrentes en un 38.5% (5/13) de los casos estudiados. Entre estos casos se observaron ejemplos de: i) reinfección exógena, a menudo causados por una cepa más resistente, ii) microevolución, con la aparición de nuevas variantes clonales generadas a partir de una cepa inicial, y iii) situaciones más complejas en las que se observó la combinación de fenómenos de microevolución, coinfección y competición.

MIRU-VNTR es, por tanto, una herramienta rápida en la obtención de genotipos directamente de aislados archivados, sin necesidad de subcultivo ni purificación del ADN. MIRU-VNTR podría ser aplicada en el rastreo rápido y masivo de colecciones de

aislados archivados de *M. tuberculosis*, lo que permitiría establecer la dimensión real de la complejidad clonal en la infección por *M. tuberculosis*.

Research article

Open Access

Rapid clonal analysis of recurrent tuberculosis by direct MIRU-VNTR typing on stored isolates

Ana Martín, Marta Herránz, María Jesús Ruiz Serrano, Emilio Bouza and Darío García de Viedma*

Address: Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. CIBER Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Universidad Complutense, Madrid, Spain

Email: Ana Martín - anamartsan@yahoo.es; Marta Herránz - m_herranz01@hotmail.com; María Jesús Ruiz Serrano - mruiz@hugum.salud.madrid.org; Emilio Bouza - ebouza@microb.net; Darío García de Viedma* - dgriedma@microb.net

* Corresponding author

Published: 30 July 2007

Received: 25 April 2007

BMC Microbiology 2007, 7:73 doi:10.1186/1471-2180-7-73

Accepted: 30 July 2007

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/7/73>

© 2007 Martín et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: The application of molecular tools to the analysis of tuberculosis has revealed examples of clonal complexity, such as exogenous reinfection, coinfection, microevolution or compartmentalization. The detection of clonal heterogeneity by standard genotyping approaches is laborious and often requires expertise. This restricts the rapid availability of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) genotypes for clinical or therapeutic decision-making. A new PCR-based technique, MIRU-VNTR, has made it possible to genotype MTB in a time frame close to real-time fingerprinting. Our purpose was to evaluate the capacity of this technique to provide clinicians with a rapid discrimination between reactivation and exogenous reinfection and whether MIRU-VNTR makes it possible to obtain data directly from stored MTB isolates from recurrent episodes.

Results: We detected differences, between the MIRUtypes of recurrent isolates in 38.5% (5/13) of the cases studied. These included cases of i) exogenous reinfection, often with more resistant strains, ii) likely examples of microevolution, leading to the appearance of new clonal variants and iii) a combination of microevolution, coinfection and competition.

Conclusion: MIRU-VNTR rapidly obtained clinically useful genotyping data in a challenging situation, directly from stored MTB isolates without subculturing them or purifying their DNA. Our results also mean that MIRU-VNTR could be applied for easy, rapid and affordable massive screening of collections of stored MTB isolates, which could establish the real dimension of clonal heterogeneity in MTB infection.

Background

Until recently, infection by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) has been assumed to be clonally simple, and a tuberculosis (TB) case was traditionally thought to be infected by a single MTB strain. The introduction of molecular biology tools into the clinical microbiology

laboratory has shown that this infection is sometimes clonally complex. In this sense, fingerprinting of clinical cultures has revealed i) exogenous reinfection as a cause of recurrences more often than originally thought [1-5], ii) simultaneous coinfection with different MTB strains [4-7] iii) microevolution phenomena [8,9] and iv) compart-

mentalization of the infection, with different strains infecting different tissues [9,10], or even independent lung sites [11].

Clonal complexity in TB is now well documented, and clinicians are increasingly requesting characterization of the strains involved in these cases, mainly to discriminate between reinfection and reactivation. However, RFLP-based or spoligotyping-based fingerprinting approaches do not provide results quickly enough to include MTB genotypes in the pool of the first-line microbiological data available to take clinical, therapeutic or epidemiological decisions.

A new PCR-based fingerprinting technique, MIRU-VNTR [12], has been considered a suitable alternative for the simple and rapid detection of clonal complexity in TB [7,13,14]. We verified whether MIRU-VNTR could provide a rapid answer in conditions mimicking a real clinical situation: when MTB is cultured from a patient who had a previous TB episode and the clinician demands the discrimination between reactivation and exogenous reinfection. We evaluated the efficiency of MIRU-VNTR for the rapid analysis of clonal complexity in recurrent cases directly from a collection of frozen-stored MTB isolates, without subculturing them or purifying DNA.

Results

We were able to analyze the sequential MTB isolates of 58 patients with two or more recurrent TB episodes (2–5 episodes separated by intervals of between 6 months and 5 years). Thirty-two stored MTB isolates from 13 representative cases of recurrences (Table 1) were selected for MIRU-VNTR genotyping.

We could amplify at least ten of the 12 MIRU targets from twenty-nine stored clinical isolates (90.6%). In an additional case we were only able to obtain a fingerprint from six loci. For the remaining two isolates, no MIRU loci were amplified (corresponding to two isolates from the years 1997 and 2003) and for one of these, MTB was not recovered after subculture.

Clonal analysis of recurrences

We compared the genotypes of the recurrent isolates obtained directly from the stored isolates. We found different MIRU types in the recurrent isolates in 5 of the 13 patients (38.5%; cases A, I, J, K, L) and identical MIRU types were detected for the remaining eight cases (Table 1, Figures 1 and 2). A highly discriminatory MIRU set of 15 loci was also applied with these eight cases and identical patterns for the sequential episodes were again obtained (data not shown). In three of the patients with clonal differences the isolates differed in two or more loci, including one case whose sequential isolates differed in six loci.

For patients I, J, K, i.e. those with differences in two or more than two MIRU loci, the RFLP and spoligotyping analysis confirmed the participation of different MTB strains (reinfection) in the first and recurrent episodes (Figure 1). In addition, in two of these cases (I and K) the susceptibility pattern of the sequential isolates changed from susceptible to resistant (Figure 1).

In patients L and A, the differences between recurrent isolates were more subtle, and affected only one locus (Figure 2). RFLP and spoligotype showed identical patterns for these clonal variants. Therefore we considered that these cases could be microevolution phenomena and not true reinfections. Whereas case L was an example of likely simple microevolution, a much more complex situation was detected for case A (Figure 2). This patient was initially infected by a single strain. However, a clonal variant appeared in the second episode, and continued to coinfect the patient together with the parental clone. This coinfection by both clonal variants was detected in the second, third and fourth episodes and finally, the first variant was the only one recovered from the fifth episode. In this case we observed differences in susceptibility patterns for pyrazinamide in the sequential episodes (Figure 2).

Discussion

The introduction of molecular biology tools in the clinical setting has revealed that MTB infection is clonally complex and that exogenous reinfection [1–5], simultaneous coinfection [4–7], compartmentalization [9,10] and microevolution [8,9] are examples of this clonal complexity.

In the past, clinicians assumed that clonal complexity had no impact on the management of TB and it was considered to be merely a refinement of the microbiological analysis. However, there are reports of TB cases with clonal complexity in which the strains can differ in their susceptibility patterns [11,15–17], infectivity [18], or ability to infect extrapulmonary sites [9,10]. This has alerted clinicians to the usefulness of accessing to advanced molecular microbiological analysis.

The procedures usually applied to detect clonal heterogeneity are based on low-intensity RFLP bands or on the analysis of multiple single MTB colonies from culture. They are cumbersome, require expertise and cannot provide a quick answer in a real clinical setting. Recently, a novel genotyping method, MIRU-VNTR [12], has been proposed as an alternative to simplify and optimize the detection of clonal complexity directly from culture [13,19].

In this study, we evaluate the efficiency of MIRU-VNTR at providing a rapid answer to a frequent request by clini-

Table 1: Characteristics of the patients. IVDU: intravenous drug user

PATIENT	SEX	AGE	RISK FACTORS	EPISODES*	EVIDENCE OF NON-ADHERENCE TO THERAPY	CLONAL HETEROGENEITY
A	Female	44		9 (4)	+	+
B	Male	50	IVDU	2	+	
C	Male	46		4 (2)		
D	Male	45	HIV+, IVDU, Prison	2	+	
E	Male	28		3	+	
F	Male	57	Alcoholism	4 (3)		
G	Male	52	Alcoholism	2	+	
H	Male	32	HIV+, IVDU	4	+	
I	Female	31	HIV+, IVDU	2		+
J	Male	46	HIV+, IVDU	2		+
K	Male	46	HIV+, Alcoholism	2		+
L	Male	53	IVDU, Alcoholism, Prison	3 (2)		+
M	Male	53		2		

*: The number of episodes with MTB isolates that could be analyzed by MIRU-VNTR are indicated in brackets.

cians, the discrimination between reactivation and exogenous reinfection in recurrent cases. Recurrence is not an anecdotal aspect of TB, and between 1 and 11% of cases have a second recurrent episode (7% in our context). Rapid identification of recurrences caused by exogenous reinfection could influence therapeutic and epidemiological decisions because susceptibility could be different and the patient should be considered a new case. Besides, when a case is assumed to be a relapse, rapid information on exogenous reinfection by a strain spreading in the community could indicate new recent-transmission routes and guarantee rigor in the assignment of clusters indicating ongoing transmission events.

We evaluated the efficiency of MIRU-VNTR in studying the clonal composition of a selection of recurrent cases by analyzing our collection of frozen-stored isolates directly, without subculturing them or purifying DNA for the molecular study. It is common in the clinical context that MTB is cultured from a patient who had a previous TB episode and the isolate from the first episode is available in the strain-collection of the microbiology department. However, it is required to subculture the stored isolate before performing the comparative analysis, which means a great delay. The design we evaluate offers the possibility of analyzing stored isolates directly, in order to rapidly discriminate between reactivation and exogenous reinfection.

For 29 of the 32 selected isolates we obtained data (in at least 10 of the 12 loci studied), which shows the high power of resolution of MIRU-VNTR typing in this chal-

lenging setting. In some cases, certain loci failed to be amplified directly from the stored isolates, and they could be amplified from new subcultures; however we have preferred to show only the results obtained from the direct amplification of stored isolates. In the case of the two loci that could not be often amplified (loci 10 and 16), we had previously observed (data not shown) that they were less efficiently amplified even with purified DNA samples. A remarkable feature is that the analysis could be performed even with isolates stored over a long period (study period: 1990–2006) and most of them were successfully amplified.

The 13 patients in our study population yielded 5 cases with some degree of clonal heterogeneity. In three of these cases (patients I, J, K) changes in two or more loci were observed between the recurrent isolates, suggesting an exogenous reinfection with a different strain. These results were confirmed by the clearly different RFLP types and spoligotypes after subculturing and analyzing the same isolates. It is worth noting that in two of these three cases, reinfection was associated with a change in the susceptibility patterns, from a susceptible strain to an INH-resistant strain, which is highly relevant for therapy. The patients analyzed in this study were different to those selected in a previous report [5] (33% reinfections) and, again, the rates of reinfection (23%) were higher than expected for a context with a moderate incidence of TB. The good correlation between VNTR-MIRU data and RFLP/spoligotyping indicated that differences in a small number of loci (in our case, two) could identify different strains without requiring standard genotyping analysis. In

PATIENT	Episodes	Drug susceptibility	MIRU-type	RFLP-type	Spoligotype
	I	EPISODE 1	Susceptible	2 2 5 <u>2</u> 5 1 5 4 3 2 1	
	EPISODE 2	INH-R, STR-R	----- <u>6</u> - 1 3 0 1 0		
PATIENT	Episodes	Drug susceptibility	MIRU-type	RFLP-type	Spoligotype
	J	EPISODE 1	Susceptible	<u>2</u> 2 4 3 2 6 1 5 3 3 2 <u>2</u>	
	EPISODE 2	Susceptible	<u>1</u> 2 4 3 2 6 1 5 3 3 2 <u>3</u>		
PATIENT	Episodes	Drug susceptibility	MIRU-type	RFLP-type	Spoligotype
	K	EPISODE 1	Susceptible	2 2 <u>5</u> - <u>1</u> 3 1 5 3 3 2 2	
	EPISODE 2	INH-R	2 2 <u>3</u> - <u>2</u> 2 1 5 3 3 2 2		

Figure 1
Susceptibility and genotyping features of the isolates from cases with reinfections. Differences in the MIRUtypes are boxed

this sense, a recent study in Shanghai [20] found that differences even in only one tandem repeat in a single MIRU locus enabled the identification of reinfections that were later confirmed by RFLP.

Although this study analyzed recurrent cases to distinguish reinfection from reactivation we found indirectly that the MIRU-VNTR approach succeeded in detecting clonal complexity other than reinfection. We identified another two cases with clonal heterogeneity (patients A and I.) but only subtle differences in one locus were detected. One of the cases (I.) had only 6 bands in the RFLP type and it could be a non clonal case [21]. However, these patients could also be likely examples of microevolutions leading to the appearance of clonal variants more than examples of reinfections, although appearance of clonal variants linked to MIRU-VNTR microevolution events has been found to be rather infrequent in other studies (2–6% of the clonal cases)[22]. These recurrent isolates shared identical RFLP and spoligotypes which suggests that MIRU-VNTR has a higher sensitivity for detecting subtle genetic differences, although other studies [14] have shown that MIRU failed to detect subtle differences in RFLP types. The appearance of clonal variants in the context of an infection is not usually considered relevant but we report that it could be significant as seen in a case infected by two clonal variants with high genotypic

similarity but with different infective behaviours; only one of them was able to infect the CNS whereas the other was restricted to the respiratory site [9]. The potential differential ability to cross the blood-brain barrier between both coinfecting variants is now being analyzed.

The situation of one of the patients whom clonal variants were found (case A) was complex, with a likely combination of microevolution, coinfection and competition. Here, our results could indicate that from an initial strain responsible for the first episode, another clonal variant was originated by genetic drift. The appearance of this second clone could be associated with the acquisition of resistance to pyrazinamide. Both clonal variants coinfecting the patient over four years and finally, the original clone competed with the microevolved clone and the infection recovered its initial clonal homogeneity, with only the initial clone infecting the patient. However, it could also be considered that the absence of the second clone in the last specimen was caused by a sampling effect. Anyway, this interesting case shows that MTB infection could be a very dynamic process in clonal terms.

Our sample might be considered too small to enable clonal heterogeneity to be detected, nevertheless we detected a high percentage of these cases which suggests that clonal variability could be detected more frequently

PATIENT	Episodes	Drug susceptibility	MIRU-type	RFLP-type	Spoligotype
	L	EPISODE 1	Susceptible	2 2 3 _ 2 6 1 5 3 3 2 5	
EPISODE 2		Susceptible	2 2 3 _ 2 6 1 5 3 3 2 2		

PATIENT	Episodes	Drug susceptibility	MIRU-type	RFLP-type	Spoligotype
	A	EPISODE 1	INH-R, RIF-R	2 2 3 5 2 5 1 5 3 3 2 2	Not available
EPISODE 2		INH-R, RIF-R	2 2 3 5 2 5/6 1 5 3 3 2 2		
EPISODE 3		INH-R, RIF-R, PZA-R	2 2 3 5 2 5/6 1 5 3 3 2 2		
EPISODE 4		INH-R, RIF-R, PZA-R	2 2 3 5 2 5/6 1 5 3 3 2 2		
EPISODE 5		INH-R, RIF-R, PZA-R	2 2 3 5 2 5 1 5 3 3 2 2		

Figure 2
Susceptibility and genotyping features from cases with subtle changes in the clonal composition of the isolates. Differences in the MIRUtypes are boxed

than expected. Moreover, the clonal complexity detected in this study reveals only a part of the real situation due to a potential underdetection of clonal heterogeneity caused by i) the fact that we could not obtain information from two loci in many cases, ii) the notion that MIRU 12 has low discriminatory power compared with a recently developed version with 15 loci [23,24], and iii) the potential selection of certain MTB clones that could be present in clinical specimens but that could be counterselected and masked after culture.

Conclusion

In summary, MIRU-VNTR is an efficient technique for studying the clonal composition of MTB even in challenging laboratory circumstances such as the direct analysis of frozen-stored isolates without subculturing them or purifying DNA. It offers the possibility of rapidly answering clinical requests for identification of exogenous reinfection, reactivation or coinfection during the infection of patients with recurrent TB.

Methods

Patients

We analyzed patients from the general population with two or more TB episodes (MTB-positive culture) at least six months apart, during the period 1990–2006. From the 3237 cases with frozen-stored MTB clinical isolates for that period of time, 58 (1.8%) were recurrent cases. From these, we selected 13 cases (all autochthonous Spanish cases) that were representative of a different number of

episodes with different intervals between episodes. All but one (urine, case J) corresponded to respiratory samples.

Samples

The stored frozen samples contained two loopfuls of MTB culture suspended in 1.5 ml of storage medium (7H19 Middlebrook 4.7 g/ml, sucrose 5%, glycerin 2%, OADC 10%). The frozen samples had been stored at -70°C from culture until analysis.

MIRU-VNTR typing

DNA was extracted by sonication in a water-bath sonicator (GenProbe) as described elsewhere [25]. Between 500 and 700 µl of the stored culture was sonicated for seven minutes in the presence of 106-micrometers glass beads (SIGMA). DNA was not purified. 5 microliters of the crude extract was used for the typing assays by MIRU-VNTR using the 12-loci format [12]. Amplified products were run in a 2% MS8 agarose gel (Pronadisa, Madrid, Spain) for 16.5 hours at 75V to calculate the number of tandem repeats for each locus.

The potential involvement of laboratory cross-contamination in the misassignment of genotypes was ruled out by comparing the genotypes of all the isolates coprocessed (within a 3-day period) in the laboratory for each of the samples.

IS6110-RFLP and spoligotyping

For the cases in which MIRU typing detected genotypic differences between the isolates from the recurrent episodes,

additional typing by IS6110-RFLP and spoligotyping was performed. For this purpose, the stored clinical MTB isolates were subcultured in Lowenstein-Jensen slants for three weeks. DNA was purified from the culture and RFLP and spoligotyping were performed following standard procedures [26,27]. Computer-assisted analysis of fingerprints was carried out using Bionumeric 5.1 software.

Susceptibility test

Susceptibility testing against isoniazid, rifampin, streptomycin, pyrazinamide and ethambutol was performed using the mycobacterial growth indicator SIRE system (Becton Dickinson).

Authors' contributions

Ana Martín: She has performed all the experimental assays and the MIRU typing, she has analyzed the results and produced the first version of the MS

Marta Herranz: She has done the RFLP and spoligotyping

María Jesús Ruiz Serrano: She has done all the microbiological procedures

Emilio Bouza: He has revised critically the final version of the MS

Darío García de Viedma*: He has designed the study, supervised all experimental work, analyzed the results, corrected and produced the final version of the MS

Acknowledgements

We thank Sofia Samper (Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, Spain) for the MIRU data from the first episode of case A. We are indebted to Thomas O'Boyle for proofreading and editing the manuscript. A.M is receptor of a grant from Comunidad de Madrid cofinanced by the European Social Fund (Order n 5297/2006)

This study was partially financed by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS030654; FIS060882) and by Instituto de Salud Carlos III (CIBER Enfermedades Respiratorias CB06/06/0058). Potential conflict of interest: No conflict for all authors.

References

- 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**(16):1174-1179.
- Bandera A, Gori A, Catozzi L, Degli Esposti A, Marchetti G, Molteni C, 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**(6):2213-2218.
- Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, Rodriguez JC, Afonso O, Martin C, Pavon 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* 2001, **163**(3 Pt 1):717-720.
- 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**(5):615-620.
- García de Viedma D, Marin M, Hermangomez S, Diaz M, Ruiz Serrano MJ, Alcalá L, Bouza E: **Tuberculosis recurrences: reinfection plays a role in a population whose clinical/epidemiological characteristics do not favor reinfection.** *Arch Intern Med* 2002, **162**(16):1873-1879.
- Warren RM, Victor TC, Streicher EM, Richardson M, Beyers N, van Pittius NC, van Helden PD: **Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen.** *Am J Respir Crit Care Med* 2004, **169**(5):610-614.
- Shamputa IC, Jugheli L, Sadradze N, Willery E, Portaels F, Supply P, Rigouts L: **Mixed infection and clonal representativeness of a single sputum sample in tuberculosis patients from a penitentiary hospital in Georgia.** *Respir Res* 2006, **7**:99.
- Glynn JR, Yates MD, Crampin AC, Ngwira BM, Mwaungulu FD, Black GF, Chagulukwa SD, Mwafulirwa DT, Floyd S, Murphy C, Drobniewski FA, Fine PE: **DNA fingerprint changes in tuberculosis: reinfection, evolution, or laboratory error?** *J Infect Dis* 2004, **190**(6):1158-1166.
- García de Viedma D, Marin M, Andres S, Lorenzo G, Ruiz-Serrano MJ, Bouza E: **Complex clonal features in an mycobacterium tuberculosis infection in a two-year-old child.** *Pediatr Infect Dis J* 2006, **25**(5):457-459.
- García de Viedma D, Marin M, Ruiz Serrano MJ, Alcalá L, Bouza E: **Polyclonal and compartmentalized infection by Mycobacterium tuberculosis in patients with both respiratory and extrapulmonary involvement.** *J Infect Dis* 2003, **187**(4):695-699.
- Kaplan G, Post FA, Moreira AL, Wainwright H, Kreiswirth BN, Tanverdi M, Mathema B, Ramaswamy SV, Walther G, Steyn LM, Barry CE 3rd, Bekker LG: **Mycobacterium tuberculosis growth at the cavity surface: a microenvironment with failed immunity.** *Infect Immun* 2003, **71**(12):7099-7108.
- Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C: **Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of Mycobacterium tuberculosis based on mycobacterial interspersed repetitive units.** *J Clin Microbiol* 2001, **39**(10):3563-3571.
- García de Viedma D, Alonso Rodríguez N, Andres S, Ruiz Serrano MJ, Bouza E: **Characterization of clonal complexity in tuberculosis by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**(11):5660-5664.
- Shamputa IC, Rigouts L, Eyongeta LA, El Aila NA, van Deun A, Salim AH, Willery E, Locht C, Supply P, Portaels F: **Genotypic and phenotypic heterogeneity among Mycobacterium tuberculosis isolates from pulmonary tuberculosis patients.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**(12):5528-5536.
- Post FA, Willcox PA, Mathema B, Steyn LM, Shean K, Ramaswamy SV, Graviss EA, Shashkina E, Kreiswirth BN, Kaplan G: **Genetic polymorphism in Mycobacterium tuberculosis isolates from patients with chronic multidrug-resistant tuberculosis.** *J Infect Dis* 2004, **190**(1):99-106.
- Turett GS, Fazal BA, Justman JE, Alland D, Duncalf RM, Telzak EE: **Exogenous reinfection with multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis.** *Clin Infect Dis* 1997, **24**(3):513-514.
- Horn DL, Hewlett D Jr., Haas WH, Butler WR, Alfalla C, Tan E, Levine A, Nayak A, Opal SM: **Superinfection with rifampin-isoniazid-streptomycin-ethambutol (RISE)-resistant tuberculosis in three patients with AIDS: confirmation by polymerase chain reaction fingerprinting.** *Ann Intern Med* 1994, **121**(2):115-116.
- García de Viedma D, Lorenzo G, Cardona PJ, Rodríguez NA, Gordillo S, Serrano MJ, Bouza E: **Association between the infectivity of Mycobacterium tuberculosis strains and their efficiency for extrapulmonary infection.** *J Infect Dis* 2005, **192**(12):2059-2065.
- 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**(6):783-789.
- Shen G, Xue Z, Shen X, Sun B, Gui X, Shen M, Mei J, Gao Q: **Recurrent tuberculosis and exogenous reinfection, Shanghai, China.** *Emerg Infect Dis* 2006, **12**(11):1776-1778.
- Cowan LS, Diem L, Monson T, Wand P, Temporado D, Oemig TV, Crawford JT: **Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of Mycobacterium tuberculo-**

OBJETIVO 4:

Analizar si el cultivo de las muestras clínicas puede modificar la composición clonal de *M. tuberculosis* presente en las mismas.

La composición clonal de *M. tuberculosis* presente en las muestras clínicas puede verse modificada tras su cultivo

En revisión en Tuberculosis (enviado en Diciembre de 2009).

RESUMEN

La aplicación de herramientas moleculares ha desvelado que la infección por *M. tuberculosis* es más compleja de lo que inicialmente se asumía. Las técnicas de genotipado se aplican generalmente sobre aislados cultivados, no teniéndose información acerca de la complejidad clonal bacteriana existente en las muestras clínicas y de si los procedimientos habituales de cultivo pueden modificar esta complejidad. En este estudio se realizó un ensayo *in vitro* para aclarar si el cultivo puede modificar la complejidad clonal presente en las muestras clínicas. En este ensayo, se combinaron cepas de *M. tuberculosis* (10 parejas) o esputos con baciloscopia positiva (4 parejas) en distintas proporciones. El ADN extraído de cada una de las mezclas antes y después del cultivo fue genotipado por MIRU-VNTR con el fin de detectar cambios potenciales en las proporciones de cada una de las cepas combinadas.

En 6/10 parejas de cepas y en 2/4 parejas de esputos se observaron cambios marcados en la composición clonal tras el cultivo; estos cambios tuvieron lugar incluso en mezclas de cepas con diferente patrón de sensibilidad. En algunos de los casos sólo una de las cepas de la pareja fue detectada tras el cultivo. Estos resultados sugieren que la complejidad clonal inicial en las muestras clínicas podría estar subestimándose si el genotipado se realiza tras su cultivo. Es necesario optimizar las técnicas de genotipado para que puedan ser aplicadas al análisis directo de las muestras clínicas para poder establecer la dimensión real de la complejidad clonal en la infección por *M. tuberculosis*.

The clonal composition of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens could be modified by culture

Ana Martín,¹ Marta Herranz,^{1,2} María Jesús Ruiz Serrano,^{1,2} Emilio Bouza,^{1,2,3}

Darío García de Viedma*^{1,2,3}

¹Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain

²CIBER Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid, Spain

³Universidad Complutense Madrid

*Corresponding author:

Darío García de Viedma, PhD

Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas

Hospital Gregorio Marañón

C/ Dr Esquerdo 46

28007 Madrid, Spain.

Fax: 91 5044906

E-mail: dgvedma2@gmail.com

Running head: Impact of culture on *M. tuberculosis* clonal complexity

Word count:

Abstract: 204

Text: 3297

No conflict of interests for any author

Abstract

Background: The application of molecular tools has revealed that infection by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) is more complex than initially assumed. Genotyping is generally performed on cultures. However, there is no information about bacterial clonal complexity in clinical specimens or whether standard culture procedures can modify this complexity.

Methods: An *in vitro* assay was performed to determine whether culture can modify the clonal complexity of the MTB population in clinical specimens. Pairs of MTB strains (10 pairs) or stain-positive sputa (4 pairs) were mixed in different volumetric proportions. The DNA extracted from the mixtures before and after culture was genotyped using mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat analysis to detect potential changes in the proportion of the mixed strains.

Results: In 6/10 pairs of MTB strains and 2/4 pairs of sputa, marked changes were observed in clonal composition after culture, even in mixtures of strains differing in their drug-susceptibility patterns. In some cases, only one of the mixed strains was detected after culture.

Conclusions: The initial clonal composition in bacteriologically complex clinical specimens could be underestimated if genotyping analysis is performed after culture. Genotyping strategies aimed at analyzing clinical samples must be optimized to reveal the real dimension of clonal complexity in infection by MTB.

Keywords: Tuberculosis. Clonal complexity. Genotyping. MIRU-VNTR.

Introduction

It is traditionally assumed that infection by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) involves a single strain. However, in recent years, the application of genotyping tools (initially developed for epidemiological purposes [1-4]) to the analysis of the bacterial populations in specific clinical cases has revealed that the clonal composition of the bacterial populations involved in some cases of tuberculosis is more complex than initially assumed. Different clonally complex phenomena have been observed, including mixed infections with more than one strain [5-8] and different strains infecting independent anatomical sites [9] or different sites within the lung [10].

As the concept of clonal complexity has gained ground, it has been suggested that standard procedures in clinical microbiology laboratories could be underestimating such phenomena. Some studies have suggested that several serial isolates per episode should be analyzed to improve detection of clonal heterogeneity [11-13].

Unfortunately, conventional genotyping tools are not sensitive enough to analyze clinical samples directly, and most studies have applied them only on cultured isolates [4, 14, 15]. In this study, we used mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat (MIRU-VNTR) genotyping in *in vitro* combinations of MTB strains and respiratory samples to explore whether standard culture procedures could be masking the clonal complexity of the clinical samples.

Materials and Methods

***In vitro* combination assays**

Combination of cultured strains of *Mycobacterium tuberculosis*

MTB strains were grown in 7H9 broth liquid media (Difco™ Middlebrook, Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA) supplemented with 10% albumin-dextrose-catalase (Becton Dickinson) and 0.05% Tween 80. The bacterial load in each culture was estimated by measuring optical density (OD) values using a CO 8000 Biowave Personal Cell Density Meter (WPA, Biochrom Ltd). Pairs of strains with equivalent OD values were combined in different volumetric proportions (90:10, 10:90, 95:5, 5:95, and 50:50: in a final volume of 1 ml). Two hundred microliters of these mixtures was cultured in either Lowenstein-Jensen slants or 7H9 broth liquid medium for 2-3 weeks.

+ In all the mixtures, the MIRU-types of the isolates were known before the analysis (with allelic variations in at least 4 to 8 loci) to ensure that genotypically different strains were combined.

Combination of respiratory samples

Decontaminated stain-positive sputa were selected from our frozen-specimen collection. The MIRU-type of the strains isolated from each sputum specimen was known, because they had previously been genotyped for epidemiological purposes and

were all different. The MIRU-types of the strains in each pair showed differences in at least 5 to 12 loci.

The sputa were centrifuged at 3500 rpm for 15 min at 4°C. The pellet was resuspended in 500 µl of phosphate buffer saline, of which 100 µl was inoculated in 7H9 broth liquid medium to test the viability of the bacilli, and the remaining 400 µl was used in the combination assays. Suspended pellets with an equivalent bacterial load estimated by fluorescence microscopy were mixed in pairs. The final volume of each mixture was 800 µl, and 200 µl was cultured in 7H9 broth liquid medium for 2-3 weeks.

Genotypic analysis of the *in vitro* mixtures

We performed two types of analysis in order to detect potential changes after culture in the proportion of the combined strains from each pair. Initially, we followed a “direct” approach by applying MIRU-VNTR analysis directly to the mixtures before and after culture in order to obtain qualitative information about the potential changes caused by culture. Next, we followed a “refined” approach, by genotyping multiple independent colonies obtained after plating each mixture before and after culture. This allowed us to obtain more precise quantitative data about the relative proportions of the combined strains in each pair and to define the magnitude of the changes after culture.

Direct approach

MIRU-VNTR analysis was performed directly on 800 µl of the initial mixtures (inoculum) and also on a loopful of the culture obtained after incubation of the inoculum in Lowenstein-Jensen slants for 2-3 weeks (culture). DNA was extracted by

boiling the suspensions for 10 min: 5 µl of the extract was used for MIRU-VNTR analysis following standard procedures [16]. We selected only one of the five multiplex polymerase chain reactions (PCRs) in the MIRU15 format to detect potential changes in the strain mixtures. We ensured that the multiplex PCR selected included at least 2 loci at which the strains showed differences. The amplified products were analyzed by capillary electrophoresis [16] and, only in certain cases, by agarose gel electrophoresis. Qualitative changes in the proportion of the strains after culture were evaluated by comparing the amplification signal for each of the combined strains.

Refined approach

The refined approach was performed on a selection of pairs of MTB strains and on all the mixtures of sputa. Serial dilutions were obtained directly from the initial mixtures (inoculum) and from the cultures obtained after 2-3 weeks in 7H9 broth liquid medium (culture). These serial dilutions were plated on 7H11 agar plates (Difco™ Mycobacteria, Becton Dickinson) supplemented with 10% oleic acid-albumin-dextrose-catalase (Becton Dickinson). Thirty independent colonies were picked from the plates and inoculated in liquid media in Mycobacteria Growth Indicator Tubes (Becton Dickinson) for 2 weeks. One milliliter of these cultures was used for DNA extraction and MIRU-VNTR analysis. The DNA was extracted following the same procedure as described for the direct approach, and MIRU-typing was performed in only one locus selected from those in which the strains differed. The amplified products were run in an MS8 2% agarose gel (Pronadisa, Madrid, Spain). According to the allele identified in each of the single-colony cultures, we determined the relative proportion between the two strains in each pair before and after culture.

Measurement of growth rates

Growth rates were calculated for the MTB strains involved in those mixtures that showed marked modifications in the relative proportions of the mixed strains after culture.

Each strain was cultured in 7H9 broth after adjusting the inoculum (day 0) to an OD value of 0.2 using a CO 8000 Biowave Personal Cell Density Meter (WPA, Biochrom Ltd). The bacterial load of the cultures at days 0 and 7 was calculated by plating serial dilutions on 7H11 agar plates and counting the colony-forming units (CFUs) obtained. These values were used to calculate the growth rate for each strain, defined as the slope of the line on a graph of \log_{10} CFU/ml versus time.

Additional genotyping

Additional genotyping by IS6110-restriction fragment length polymorphism (RFLP) [1] was performed in some cases to evaluate whether modifications in the clonal composition of some mixtures caused by culture could lead to misassignment of fingerprint patterns.

Results

Evaluation of changes in the clonal composition of mixtures of MTB strains

Our first objective was to define a model to rapidly screen potential changes in the clonal composition of MTB bacilli in clinical specimens after standard culture procedures. For this purpose we designed an *in vitro* assay by mixing pairs of MTB strains. Seven pairs were obtained by mixing MTB strains in 5 different volumetric proportions (Table 1). We followed a 'direct approach' to genotype the DNA extracted directly from each mixture, both before and after culture.

In three pairs (pairs A-G, B-C, and E-F), we detected no qualitative changes in the proportion of strains after culture (Table 1). However, marked differences in the proportions were observed in the remaining 4 pairs (Table 1). In these, inversions were observed in the relative proportions of the mixed strains and, in some pairs, even only one of the two mixed strains was detected after culture (Table 1). These results were detected by capillary electrophoresis analysis (Figure 1), although, in certain cases, the magnitude of the changes was so high that they could even be detected by conventional agarose gel electrophoresis (Figure 1).

Once changes in clonal composition had been detected after culture of some of the assayed mixtures, we evaluated whether these changes could also take place when strains with different drug-susceptibility patterns were mixed. We also introduced refinements in order to be able to calculate the relative proportion between the two strains as accurately as possible by analyzing multiple independent colonies.

For this purpose, we selected 3 MTB strains with different drug-susceptibility patterns—pansusceptible (PS), isoniazid-resistant (IR), and multidrug-resistant (MDR)

—and mixed them in 3 pairs (Table 2), by assaying 3 different volumetric proportions. Again, marked changes in clonal composition were observed after culture of 4 of the 9 combinations, and these always led to a reduction in (even disappearance of) the susceptible-strain.

Evaluation of changes in the clonal composition of smear-positive sputa mixtures

We applied an experimental design that was closer to real life by mixing stain-positive sputa and evaluating potential changes in clonal heterogeneity after culture. To do so, we mixed smear-positive sputa in pairs and cultured them in broth. Single colonies were obtained by plating the mixtures before broth incubation (inoculum) and after broth incubation (culture). After genotyping 30 single colonies from both the inoculum and culture, we calculated the relative proportion between the combined bacteria. In 2/4 mixtures (pairs S-T and W-X), marked changes were detected in the ratios after culture (Table 3, Figure 2).

3

Growth rates of MTB strains involved in marked changes

We selected the strains involved in those mixtures where marked changes were observed after culture to calculate their growth rates. The growth rates ranged from 0.1 to 1.57 (Table 4). In 5/8 pairs (pairs N-O, S-T, W-X, PS-RI, and PS-MDR), marked differences were observed between the growth rates of the mixed strains. In all these cases, the strains with the highest growth rates were those that had been found to be overrepresented after culture.

Additional genotyping

Finally, it was interesting to ascertain whether the magnitude of the clonal changes observed in some of the *in vitro* combination experiments would be enough to cause changes in the IS6110-RFLP patterns.

We selected two pairs of strains in which changes in the relative proportions had been observed after culture. The DNA of the corresponding strains was purified and mixed according to the proportions that we had recorded in our experiments before and after culture. IS6110-RFLP analysis was performed for these DNA mixtures and differences in the RFLP-types were observed (Figure 3).

Discussion

The application of molecular tools to the analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates has made it possible to identify examples of clonal complexity in circumstances as varied as reinfection with a different MTB strain as a cause of recurrence [14, 15, 17], mixed infections with two strains simultaneously infecting a single case [5-8], or even microevolution phenomena leading to the appearance of clonal variants from an initial strain [18, 19].

Nevertheless, detection of clonal complexity in clinical isolates has several limitations: low-intensity bands in the RFLP patterns are difficult to interpret [20], and analysis of multiple independent colonies is laborious. Besides, we could reasonably expect clonal complexity to be underdetected in most studies, because only a single isolate per patient is used for genotyping. This limitation has been criticized by some authors, whose studies reveal that the analysis of several serial isolates per patient enables more mixed infections to be detected [11]. A possible explanation for these findings is that not all the infecting MTB strains are equally represented in the clinical sample, as stated by Post et al [12]. Moreover, genotypic analysis is generally performed on cultured isolates, without considering whether culture procedures could lead to underdetection of clonal complexity, although few authors have examined the potential impact of this approach [13, 21, 22]. To the best of our knowledge, only Warren et al [5] have applied a procedure to identify genotypic heterogeneity directly in clinical samples, and very few experiments have been designed to detect potential changes in the bacterial composition of specimens due to culture [23].

Therefore, we evaluated possible changes in clonal heterogeneity caused by culture procedures and explored the clonal complexity of MTB by following an easier methodological approach than those commonly used. With this purpose, we took advantage of the rapid and easy documentation of clonal heterogeneity provided by the MIRU-VNTR method. This technique can detect a strain that is underrepresented in a mixed infection, even at only 1% of the total bacterial population [24], in contrast with the 10% required for the detection of low-intensity bands in RFLP patterns [20].

First, we used MIRU-VNTR to genotype the DNA extracted directly from all the mixtures of strains. This non-refined approach did not allow us to accurately calculate the real ratio between the strains, although it did provide a first rapid and illustrative snapshot of the changes that were taking place during culture, and it was especially suitable for revealing extreme situations where one of the strains in the mixture was not detected after culture. In such cases, the absence of amplification products due to lower amplification efficiency at certain loci was ruled out, because the same situation occurred at several independent loci in which the strains showed differences. The need to analyze amplification products using capillary electrophoresis was supported by the lower sensitivity observed in agarose gel electrophoresis, where one of the two mixed strains often went undetected if it was underrepresented. However, even conventional electrophoresis succeeded in detecting some of the most dramatic clonal changes.

We improved our assay by refining the approach, which allowed us to calculate the ratios between the strains present in the mixtures as accurately as possible by analyzing multiple independent colonies. Although a good strategy, this refining could be criticized, since, during plating, the bacterial population may have undergone an additional culture step that could have modified the clonal composition. However, Burnens et al [23] observed that differences in the bacterial composition of clinical

samples after culture were lowest when they were cultured on^{CA} solid medium. (We must remember, however, that the authors used different species rather than different strains). Moreover, if the effect of culture on clonal heterogeneity is due to interaction/competition phenomena between the strains when they are cocultured, the potential strain interaction in solid media (where dilutions were grown to obtain single colonies) seems highly improbable.

It is noteworthy that differences in clonal composition after culture were also detected when strains with different drug-susceptibility patterns were mixed. We observed marked changes in several of these mixtures, and we even found situations where the strain that was initially overrepresented was not detected after culture. These findings could be relevant, since cases of coinfection with both susceptible and drug-resistant isolates have been described [8, 13].

Finally, we attempted to provide a model that would resemble real life, by working with stain-positive respiratory samples. First, we tried to perform a prospective study by directly analyzing clonally complex respiratory samples and comparing their genotypes with those obtained from further cultured isolates. The low efficiency observed in obtaining a MIRU type directly from a clinical sample and the low frequency of mixed infections detected in our context (2.6%) [24] made it difficult to detect clonal heterogeneity in a respiratory sample. Therefore, we applied an approach based on *in vitro* combination of stain-positive sputa and, once again, modifications in the clonal composition of the specimens after culture were detected.

X When we observed modifications in clonal composition induced by culture procedures, we evaluated whether these changes could also be detected by RFLP. We selected representative strains from the mixtures whose ratios changed after culture, and we purified the DNA from these strains to be combined in the same proportions as in

the original experiment with the strains. The RFLP pattern obtained from the DNAs mixed at the proportions recorded for the inoculum clearly differed from that obtained when the DNAs were mixed at the post-culture proportions. These data indicate that the magnitude of the post-culture modifications was high, as they were also revealed by RFLP, which is not as sensitive as MIRU when identifying clonal complexity in samples.

Several factors could explain the differences in the clonal composition of some of the mixtures after culture. First, the susceptibility of mixed strains to the decontamination procedures could differ, although this is only relevant in experiments assaying mixtures of sputa. Additionally, differences in the growth rates of the strains involved could be responsible for these changes: this observation is consistent with the findings of Burnens et al [23], who showed that mixed infections are underdetected after culture of clinical samples, because faster-growing species outgrow slower-growing species.

We measured the growth rates of all the MTB strains involved in those mixtures where marked changes were observed after culture, and observed differences in 5 pairs. Strains with higher growth rates were overrepresented after culture: therefore, incubation time must be increased when a clonally heterogeneous infection is suspected, since this could increase the likelihood of detecting the slower-growing strain. In our study, the incubation time was 2-3 weeks because we followed the standard procedure of a clinical microbiological laboratory. Nevertheless, in 3 pairs where marked changes were observed after culture, no differences were found between the growth rates, suggesting that clonal modifications after culture might also be due to interaction/competition between the infecting strains when they are cocultured. This interaction/competition has been found to occur in experiments using mixtures of strains

to coinfect macrophages *in vitro* [25] and in murine models [26]. Furthermore, these phenomena could also exist at the extracellular level during *in vitro* culture. The interactions could increase the fitness of one of the strains to grow faster than the other, although this would be difficult to prove.

We observed that in mixtures of susceptible and resistant strains the resistant one always appears in a higher ratio and, in some cases, the susceptible one even is undetected after culture. This contrasts with the traditional assumption that a biological cost is paid for the acquisition of resistance [27]. However, in a study performed by Billington et al [28] to evaluate the biological cost of resistance to rifampin, the resistant mutants only showed a subtle decrease in their fitness to grow and one mutant was even found to exhibit slightly greater fitness in broth culture than that obtained for the wild type. In our case, we observed a higher growth rate in broth culture for both strains harboring resistance mutations than in the susceptible strain used in their corresponding mixtures. This could explain their behavior in cocultures containing susceptible strains.

Given that clonal complexity is increasingly assumed to be higher than initially thought due to methodological limitations and the fact that only one isolate is analyzed [11], our findings are especially relevant at different levels. The possibility that culture affects clonal complexity has both clinical and epidemiological implications. From a clinical and microbiological point of view, clonal heterogeneity could be underestimated, thus making it difficult to understand the precise role that reinfections, mixed infections, and microevolution phenomena play in MTB infection. In addition, our findings could have special implications in the study of recurrences when accurate discrimination between reactivation and reinfection is required. Moreover, at the clinical level, these findings could affect drug susceptibility tests (DSTs), since the results obtained from cultures may not accurately reflect the resistance-profile of the bacterial

population in the clinical specimen. In clonally heterogeneous cases, if both strains are not equally represented in the clinical sample and further culture reveals one of them to be competed/eliminated, it could lead to inaccuracy in the definition of the real susceptibility pattern. The role that mixed infections play in DSTs is a cause for concern, and discrepancies have been found in the DSTs of serial isolates from the same patient [11]. These findings suggest the convenience of performing DSTs directly from clinical samples, because culture results might not always correlate with the clonal complexity present in the original specimens.

To conclude, our data show how clonal complexity could be underestimated after culture. We should be concerned about this finding, particularly in settings where clonal heterogeneity is suspected. Optimization of genotyping techniques to work directly on clinical samples, combined with the analysis of several serial isolates per patient, could help us to minimize this problem.

Acknowledgements

We are indebted to Thomas O'Boyle for proofreading and editing the manuscript. We are grateful to Miguel Martinez Lirola from Complejo Hospitalario Torrecardenas for providing the sputum specimens. A.M. is the recipient of a grant from the Comunidad de Madrid, cofinanced by the European Social Fund (Order no. 5297/2006). This study was partially financed by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 02/0572, 02/1307, 02/0882, 030654: 060882) and by Instituto de Salud Carlos III (CIBER Enfermedades Respiratorias CB06/06/0058: Spanish Network for the Research in Infectious Diseases REIPI RD06/0008).

Figures and Tables

Table 1: Analysis by capillary electrophoresis of the MIRU-VNTR amplification products from the mixed MTB pairs assayed in the direct approach.

Each letter refers to an MTB strain. The relative proportion between the mixed strains in each pair in the inoculum and after culture is indicated using capital and lower-case letters as follows: XY, both strains equally represented; Xy, strain X is overrepresented; xY, strain Y is overrepresented. For those cases in which one of the combined strains was not detected after culture, only the letter for the persisting strain is shown. Those combinations where marked changes were observed after culture are highlighted in grey. The asterisk indicates that the results are shown in detail in Figure 1.²

Table 2: Analysis by MIRU-VNTR typing of single colonies obtained from the mixed MTB pairs assayed in the refined approach. The drug susceptibility pattern of each of the combined strains is indicated as follows: PS (pansusceptible), IR (isoniazid-resistant), MDR (multidrug-resistant). The ratio between the mixed strains before (inoculum) and after culture is indicated. Those combinations where marked changes were observed after culture are highlighted in grey. The asterisk indicates that the results are shown in detail in Figure 2a.³

Table 3: Analysis by MIRU-VNTR typing of single colonies obtained from the mixed sputa assayed in the refined approach. The ratio between the mixed strains in the inoculum before and after culture is indicated. Those combinations where marked

changes were observed after culture are highlighted in grey. The asterisk indicates that the results are shown in detail in Figure 2b.

Table 4: Growth rates of the MTB strains involved in pairs that showed marked changes after culture. The asterisk indicates the MTB strains that were found to be overrepresented after culture with respect to the inoculum.

Figure 1: Representative examples of the results after capillary electrophoresis following the direct approach (selected from Table I). A) No changes in the proportion of the mixed strains (E and F) after culture. B) Qualitative inversions of the proportions between the mixed strains (N and O) after culture. C) Detection of only one of the two mixed strains (L and M) after culture. The results obtained before culture of the mixtures (inoculum) are shown in the upper panel and those obtained after culture of the mixtures (culture) are shown in the lower panel. In those cases where marked changes were observed (examples B and C), the results obtained by agarose-gel electrophoresis for a representative locus (highlighted with an asterisk) are shown. The amplification fragments corresponding to each strain are indicated in the gel with the corresponding letter. Lane 1, molecular weight marker; lane 2, amplification products.

Figure 2: Examples of the representative dynamics observed in the refined approach. 2a) No marked changes in the ratio of the strains after culture; 2b) Marked changes in

the ratio of the strains after culture. Each lane shows the amplification product obtained from a single colony. The amplification products corresponding to each strain are indicated with arrows. The box below each gel summarizes the number of colonies corresponding to each strain and the ratio between them. M, marker.

NO

Figure 3: IS6110-RFLP patterns obtained from the combination of DNAs according to the ratios recorded in the inoculum and after culture for two representative pairs of strains (S and T in panel a; W and X in panel B) in the *in vitro* combination experiments. The RFLP-types for each single strain are also shown.

References

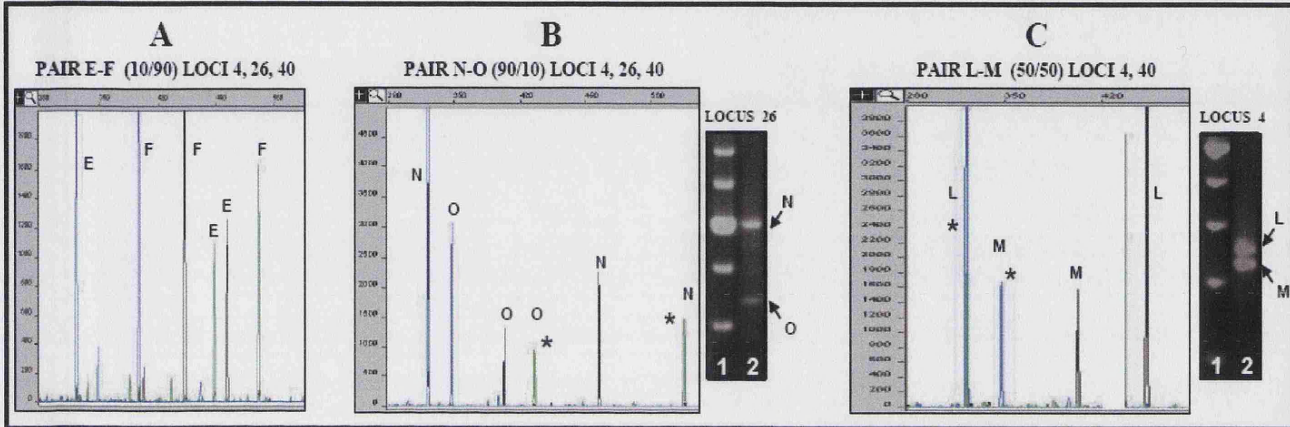
1. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM *et al*: **Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology**. *Journal of clinical microbiology* 1993, **31**(2):406-409.
2. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M *et al*: **Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology**. *Journal of clinical microbiology* 1997, **35**(4):907-914.
3. Hermans PW, Messadi F, Guebrexabher H, van Soolingen D, de Haas PE, Heersma H, de Neeling H, Ayoub A, Portaels F, Frommel D *et al*: **Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia, and The Netherlands: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology**. *The Journal of infectious diseases* 1995, **171**(6):1504-1513.
4. Alland D, Kalkut GE, 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 epidemiologic methods**. *The New England journal of medicine* 1994, **330**(24):1710-1716.
5. Warren RM, Victor TC, Streicher EM, Richardson M, Beyers N, Gey van Pittius NC, van Helden PD: **Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen**. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2004, **169**(5):610-614.
6. 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 (London, England)* 1999, **13**(5):615-620.
7. Shamputa IC, Rigouts L, Eyongeta LA, El Aila NA, van Deun A, Salim AH, Willery E, Locht C, Supply P, Portaels F: **Genotypic and phenotypic heterogeneity among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from pulmonary tuberculosis patients**. *Journal of clinical microbiology* 2004, **42**(12):5528-5536.
8. Braden CR, Morlock GP, Woodley CL, Johnson KR, Colombel AC, Cave MD, Yang Z, Valway SE, Onorato IM, Crawford JT: **Simultaneous infection with multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis***. *Clin Infect Dis* 2001, **33**(6):e42-47.
9. Garcia de Viedma D, Marin M, Ruiz Serrano MJ, Alcalá L, Bouza E: **Polyclonal and compartmentalized infection by *Mycobacterium tuberculosis* in patients with both respiratory and extrapulmonary involvement**. *The Journal of infectious diseases* 2003, **187**(4):695-699.
10. Kaplan G, Post FA, Moreira AL, Wainwright H, Kreiswirth BN, Tanverdi M, Mathema B, Ramaswamy SV, Walther G, Steyn LM *et al*: ***Mycobacterium tuberculosis* growth at the cavity surface: a microenvironment with failed immunity**. *Infection and immunity* 2003, **71**(12):7099-7108.
11. Shamputa IC, Jugheli L, Sadradze N, Willery E, Portaels F, Supply P, Rigouts L: **Mixed infection and clonal representativeness of a single sputum sample**

- in tuberculosis patients from a penitentiary hospital in Georgia. *Respiratory research* 2006, 7:99.
12. Post FA, Willcox PA, Mathema B, Steyn LM, Shean K, Ramaswamy SV, Graviss EA, Shashkina E, Kreiswirth BN, Kaplan G: **Genetic polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with chronic multidrug-resistant tuberculosis.** *The Journal of infectious diseases* 2004, **190**(1):99-106.
 13. Rinder H, Mieskes KT, Loscher T: **Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2001, **5**(4):339-345.
 14. Bandera A, Gori A, Catozzi L, Degli Esposti A, Marchetti G, Molteni C, Ferrario G, Codecasa L, Penati V, Matteelli A *et al*: **Molecular epidemiology study of exogenous reinfection in an area with a low incidence of tuberculosis.** *Journal of clinical microbiology* 2001, **39**(6):2213-2218.
 15. Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, Rodriguez JC, Afonso O, Martin C, Pavon JM, Torres MJ, Burgos M, Cabrera P *et al*: **Exogenous reinfection with tuberculosis on a European island with a moderate incidence of disease.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001, **163**(3 Pt 1):717-720.
 16. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S *et al*: **Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*.** *Journal of clinical microbiology* 2006, **44**(12):4498-4510.
 17. Garcia de Viedma D, Marin M, Hernangomez S, Diaz M, Ruiz Serrano MJ, Alcalá L, Bouza E: **Tuberculosis recurrences: reinfection plays a role in a population whose clinical/epidemiological characteristics do not favor reinfection.** *Archives of internal medicine* 2002, **162**(16):1873-1879.
 18. Glynn JR, Yates MD, Crampin AC, Ngwira BM, Mwaungulu FD, Black GF, Chaguluka SD, Mwafulirwa DT, Floyd S, Murphy C *et al*: **DNA fingerprint changes in tuberculosis: reinfection, evolution, or laboratory error?** *The Journal of infectious diseases* 2004, **190**(6):1158-1166.
 19. Garcia de Viedma D, Marin M, Andres S, Lorenzo G, Ruiz-Serrano MJ, Bouza E: **Complex clonal features in an mycobacterium tuberculosis infection in a two-year-old child.** *The Pediatric infectious disease journal* 2006, **25**(5):457-459.
 20. de Boer AS, Kremer K, Borgdorff MW, de Haas PE, Heersma HF, van Soolingen D: **Genetic heterogeneity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates reflected in IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns as low-intensity bands.** *Journal of clinical microbiology* 2000, **38**(12):4478-4484.
 21. Richardson M, Carroll NM, Engelke E, Van Der Spuy GD, Salker F, Munch Z, Gie RP, Warren RM, Beyers N, Van Helden PD: **Multiple *Mycobacterium tuberculosis* strains in early cultures from patients in a high-incidence community setting.** *Journal of clinical microbiology* 2002, **40**(8):2750-2754.
 22. Shimizu Y, Dobashi K, Yoshikawa Y, Yabe S, Higuchi S, Koike Y, Mita Y, Utsugi M, Endou K, Takahashi K *et al*: **Five-antituberculosis Drug-resistance Genes Detection Using Array System** *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 2008, **42**(3):228-234.
 23. Burnens AP, Vurma-Rapp U: **Mixed mycobacterial cultures--occurrence in the clinical laboratory.** *Zentralbl Bakteriol* 1989, **271**(1):85-90.
 24. Garcia de Viedma D, Alonso Rodriguez N, Andres S, Ruiz Serrano MJ, Bouza E: **Characterization of clonal complexity in tuberculosis by mycobacterial**

- interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing.** *Journal of clinical microbiology* 2005, **43**(11):5660-5664.
25. Garcia de Viedma D, Lorenzo G, Cardona PJ, Rodriguez NA, Gordillo S, Serrano MJ, Bouza E: **Association between the infectivity of *Mycobacterium tuberculosis* strains and their efficiency for extrapulmonary infection.** *The Journal of infectious diseases* 2005, **192**(12):2059-2065.
26. Barczak AK, Domenech P, Boshoff HI, Reed MB, Manca C, Kaplan G, Barry CE, 3rd: **In vivo phenotypic dominance in mouse mixed infections with *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates.** *The Journal of infectious diseases* 2005, **192**(4):600-606.
27. Schrag SJ, Perrot V, Levin BR: **Adaptation to the fitness costs of antibiotic resistance in *Escherichia coli*.** *Proceedings* 1997, **264**(1386):1287-1291.
28. Billington OJ, McHugh TD, Gillespie SH: **Physiological cost of rifampin resistance induced in vitro in *Mycobacterium tuberculosis*.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1999, **43**(8):1866-1869.

FIG1

1. INOCULUM



2. CULTURE

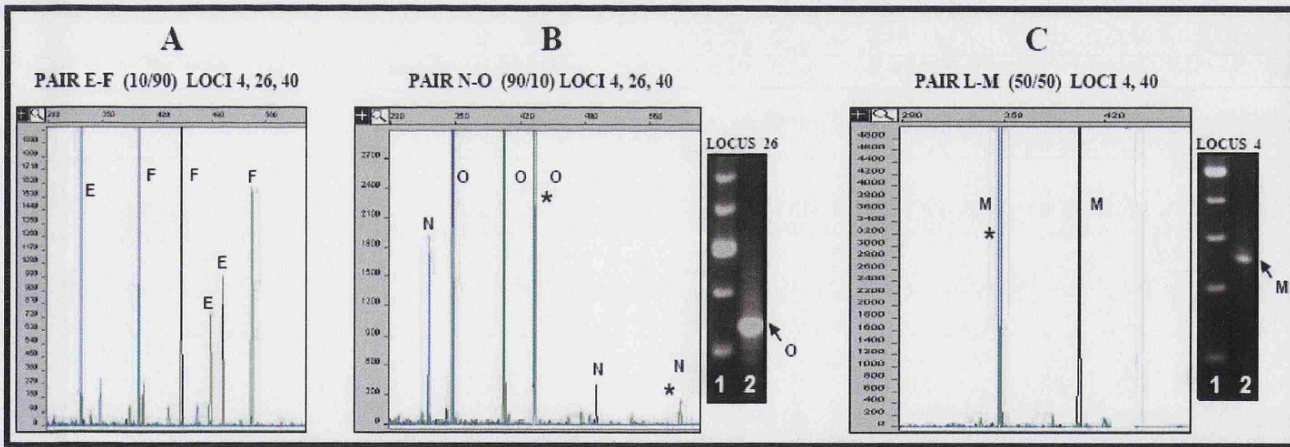
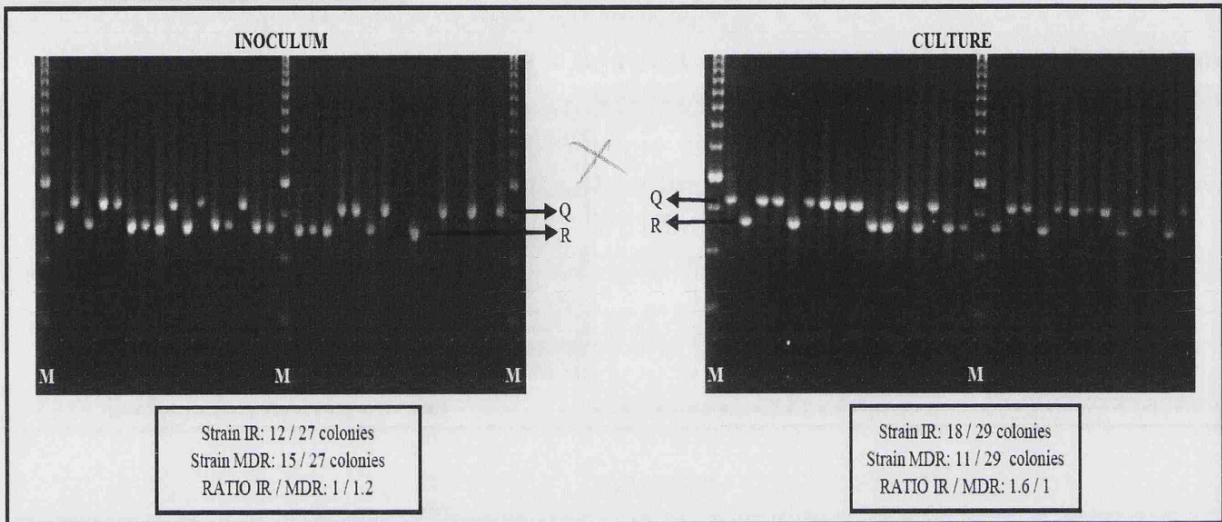


Fig2

2-a No marked changes after culture



2-b Marked changes after culture

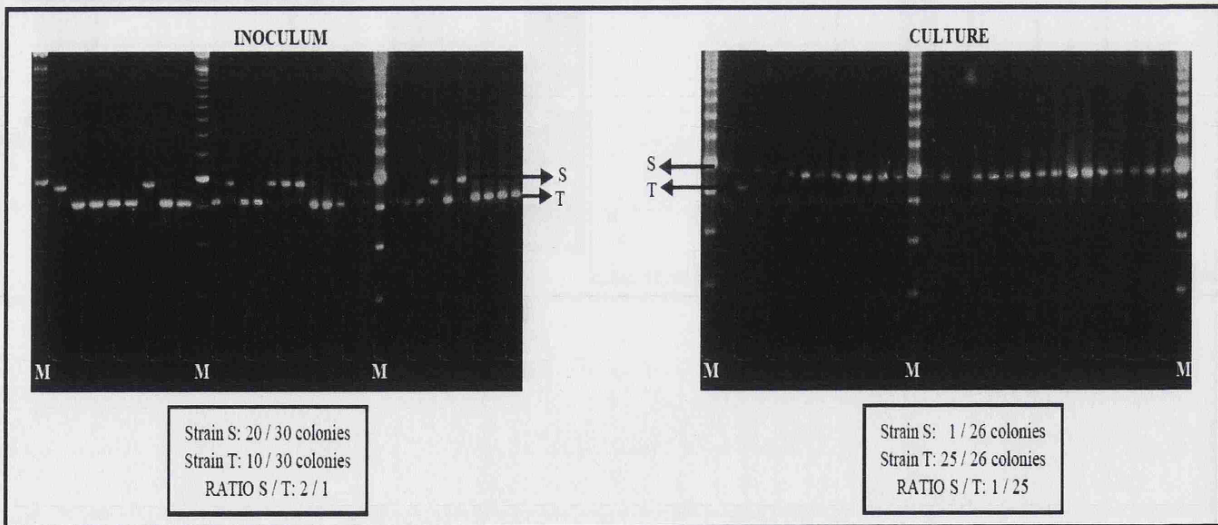
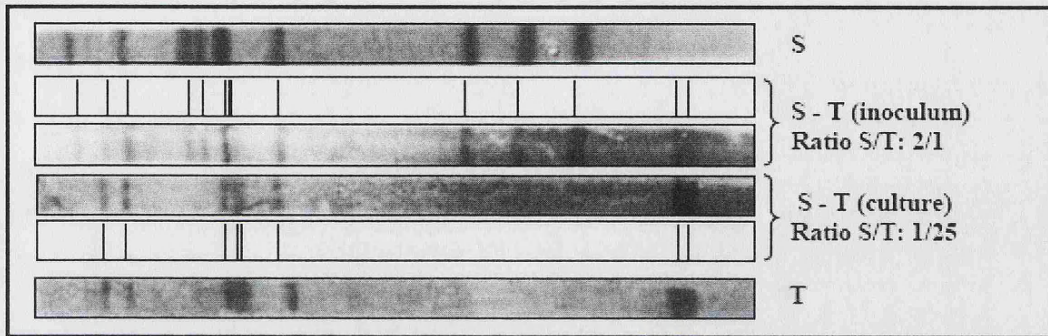


Fig3

3-a



3-b

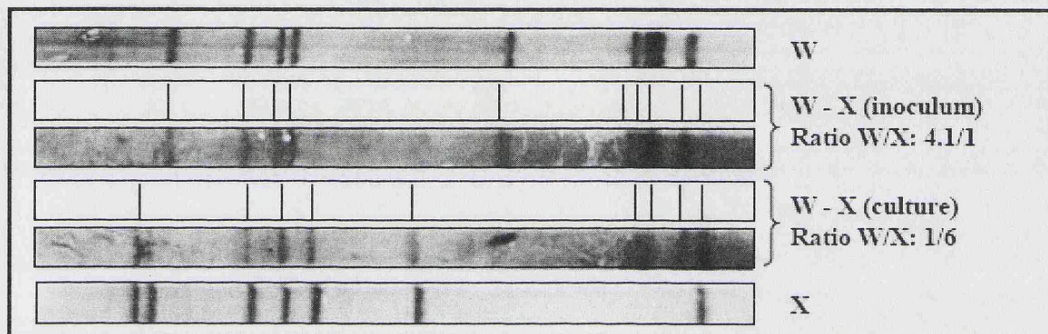


Table 1

		Volumetric proportions between the strains in the inocula					
		90/10	10/90	95/5	5/95	50/50	
Pairs of MTB strains	A - G	A - g	a - G	A - g	a - G	A - G	Inoculum
		A - g	a - G	A - g	a - G	A - G	Culture
	B - C	B - c	b - C	B - c	b - C	B - C	Inoculum
		B - c	b - C	B - c	b - C	B - C	Culture
	E - F	E - f	e - F*	E - f	e - F	E - F	Inoculum
		E - f	e - F*	E - f	e - F	E - F	Culture
	H - I	H - i	h - I	H - i	i - H	H - I	Inoculum
		I	I	h - I	I	I	Culture
	J - K	J - k	j - K	J - k	j - K	J - K	Inoculum
		j - K	j - K	J - K	K	j - K	Culture
	L - M	L - m	L - M	L - m	m - L	L - m*	Inoculum
		M	M	M	M	M*	Culture
	N - O	N - o*	n - O	N - o	n - O	n - O	Inoculum
		n - O*	O	n - O	O	O	Culture

Table 2

		Ratio in inoculum	Ratio in culture
Pairs of MTB Strains	PS - IR	3,6 / 1	Only IR is detected
		1 / 8,3	Only IR is detected
		1 / 1	Only IR is detected
	PS - MDR	1,6 / 1	1 / 1,3
		1 / 2,3	Only MDR is detected
		1 / 1	1 / 5
	IR - MDR	9 / 1	29 / 1
		1 / 9	1 / 2,7
		1 / 1,2*	1,6 / 1*

Table 3

		Ratio in inoculum	Ratio in culture
Pairs of Sputa	S - I	2 / 1*	1 / 25*
	U - V	1 / 14	1 / 4,4
	W - X	4,1 / 1	1 / 6
	Y - Z	14 / 1	8,3 / 1

Table 4

MTB STRAIN	GROWTH RATE
H	0.7
I*	0.65
J	0.7
K*	0.67
L*	0.4
M	Not available
N	0.38
O*	0.65
PS	0.4
IR*	0.72
MDR*	0.78
S	0.1
T*	1.57
W	0.29
X*	1.08

W R V

OBJETIVOS 5.1 Y 5.2:

Analizar la participación de complejidad clonal en casos considerados como reinfecciones exógenas.

Caracterizar la infectividad de cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes con reinfecciones.

“Reinfección exógena por *M. tuberculosis*: posible asignación errónea debido a infecciones policlonales y análisis del posible papel de factores bacterianos”.

Artículo enviado a Journal of Clinical Microbiology (Febrero 2010).

RESUMEN

El análisis molecular aplicado a determinados casos de tuberculosis recurrente ha puesto de manifiesto que un segundo episodio de tuberculosis puede estar causado por una cepa diferente a la aislada en el primer episodio, indicando que la reinfección exógena juega un papel importante en las recurrencias. Sin embargo, existen determinados aspectos, relacionados con las reinfecciones, que no han sido estudiados en profundidad y en este trabajo hemos querido centrarnos en el análisis de algunos de ellos.

Primeramente, se evaluó si la falta de refinamiento en el análisis molecular podría llevar a asignar erróneamente, como casos de reinfección exógena, situaciones de infección mixta en las que hubiera tenido lugar una alternancia cronológica, a lo largo de la infección, de las distintas cepas implicadas. Con este propósito, 87 aislados pertenecientes a los episodios (inicial y recurrente) de 38 pacientes se genotiparon por MIRU-VNTR. Se identificaron 10/38 (26.31%) casos con diferencias genotípicas entre los aislados pertenecientes a distintos episodios. En 7/10 casos estas diferencias sugirieron la existencia de fenómenos de reinfección exógena, mientras que en los 3 casos restantes las diferencias genotípicas fueron sutiles, más acordes con fenómenos de microevolución. En todos los casos se identificó una única cepa en el/los aislado/s pertenecientes a un mismo episodio. Este hallazgo permitió minimizar la posibilidad de que los fenómenos de reinfección exógena fueran, en realidad, infecciones mixtas con una representatividad diferente de las distintas cepas implicadas a lo largo de la infección.

A continuación, debido a que los fenómenos de reinfección exógena han sido también identificados en pacientes VIH-negativos y en contextos de baja incidencia de tuberculosis, quisimos determinar si, además de los factores socio-epidemiológicos, determinados factores de la bacteria, tales como la infectividad, pudieran tener un papel

en la reinfección. Por esta razón, se caracterizaron, en un modelo de infección *in vitro*, 12 cepas de *M. tuberculosis* aisladas de 6 pacientes con reinfecciones/microevoluciones. No se observaron diferencias significativas en la infectividad de las cepas implicadas en el primer episodio con respecto a las aisladas en el segundo episodio.

Estos resultados sugieren que, en nuestro contexto: 1) resulta improbable la asignación incorrecta de los casos de reinfección exógena, y 2) la infectividad de la bacteria parece no estar implicada en los fenómenos de reinfección exógena.

Exogenous reinfections by *M tuberculosis*: Possible misassignments due to polyclonal infections and analysis of the potential role of bacterial factors.

Ana Martín,¹ Marta Herranz,^{1,2} Sandra Lasarte,¹ María Jesús Ruiz Serrano,^{1,2} Emilio Bouza,^{1,2,3} Darío García de Viedma*^{1,2,3}

¹Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain

²CIBER Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid, Spain

³Universidad Complutense Madrid

*Corresponding author:

Darío García de Viedma, PhD

Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas

Hospital Gregorio Marañón

C/ Dr Esquerdo 46

28007 Madrid, Spain.

Fax: 91 5044906

Abstract

The molecular analysis of specific TB recurrent cases has revealed that a second episode may be caused by a new MTB strain different from that involved in the first infection, showing that exogenous reinfections play a role in TB recurrences. However, some aspects related to the study of reinfections have not been covered and, among them, we focused in two aspects that have been barely analyzed. Firstly, we evaluated whether a lack of refinement in the molecular analysis could lead to inaccurately assign as exogenous reinfections certain cases of mixed infection in which a differential selection of each of the coinfecting strains occurred along the infection. With this aim, 87 isolates belonging to the first and the recurrent episodes of 38 patients with recurrent TB were genotyped by MIRU-VNTR. We identified 10/38 (26.31%) cases with clonally complex infections, showing genotypic differences between the isolates involved in the sequential episodes. In 7/10 cases major genotypic differences were found between the sequential isolates, suggesting exogenous reinfections and, in the remaining 3 cases, only subtle genotypic differences were found, probably indicating a microevolution phenomenon from a parental strain. Only one single strain was detected in all the isolates within the same episode, minimizing the possibility that reinfections could correspond to undetected mixed infections in which a variation in the representativeness of the coinfecting strains along the infection has occurred. Secondly, we focused on the fact that reinfections were also observed in unexpected situations, such as in HIV-negative patients and in settings of low incidence of TB. This fact could suggest that not only socio-epidemiological factors would determine the occurrence of exogenous reinfections but also, certain bacterial factors, such as the infectivity of a strain, might mean an advantage for causing a reinfection. For analyzing this hypothesis, 12 MTB strains belonging to 6 patients with a clonally complex infection were selected for infectivity characterization in an *in vitro* model of infection. No main differences were observed in the infectivity of the strains involved in the first episodes compared to the infectivity of those involved in the recurrent episodes.

Our results suggest that, in our context: 1) the possibility of misassignments of exogenous reinfections is rather improbable, and 2) bacterial infectivity seems not to play a role in exogenous reinfections.

Introduction

The traditional assumption in the analysis of the infection by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) is that each episode is caused by a single MTB strain. In this sense, a recurrence is considered the result of an endogenous reactivation of the strain involved in the first episode. In recent years, the molecular tools applied to the analysis of MTB isolates from specific TB cases have revealed that a recurrent episode may also be caused by a new MTB strain, different from the one isolated in the first episode, suggesting that exogenous reinfections play a role in TB recurrences (5, 8, 26). Together with these reinfection phenomena, more complex situations with two MTB strains infecting simultaneously have also been found (5, 28), even strains infecting different anatomical sites (13) or different sites within the lung (14).

In most cases, exogenous reinfections have been observed in immunocompromised patients (8, 21) and in settings with either a high rate of TB (8, 26) or high-risk for transmission (5), suggesting that mainly socio-epidemiological factors determine the occurrence of these phenomena. However, the detection of exogenous reinfections in settings with moderate and low prevalence of TB and in both VIH-positive and VIH-negative patients (2, 4, 12) could indicate that certain bacterial factors may also be involved. In this sense, several studies of *in vivo/in vitro* models of infection have shown a higher infectivity for certain strains in which transmission and infection had been observed to be especially efficient (3, 15, 25). This fact could lead us to suggest that infectivity of strains might also be a factor involved in reinfection phenomena.

Taking together these findings related to exogenous reinfection and clonal heterogeneity in the infection by MTB, this study focused on two aspects that have not been explored: i) the possibility that exogenous reinfections could be the result of a different chronological selection of strains in patients with undetected polyclonal infections, and ii) the relative contribution of bacterial factors, such as infectivity, to the phenomenon of reinfection.

Materials and Methods:

ANALYSIS OF PATIENTS WITH RECURRENT TB

Patients

All patients with two or more culture-positive tuberculosis (TB) episodes between 1998 and 2006 in the Hospital Gregorio Marañón (Madrid) were considered. MTB isolates were stored frozen at -70° C from the moment of isolation until analysis. When available, two different isolates from independent specimens within a single episode were selected for genotyping. Some of the patients had been included in a previous study with different purposes (16) but were also included in the present study because the genotyping analysis previously applied was rather limited according to the actual standards for VNTR-MIRU typing.

Microbiological procedures

Culture and DNA extraction

All the selected isolates were subcultured in MGIT (Becton Dickinson, Sparks, Md) liquid media for 2-3 weeks at 37° C. 1ml of culture was centrifuged at 13000 rpm for 5 min. and the pellet was boiled in the presence of GeneProbe lysis reagent (1:16 diluted: bioMérieux, Geneva, Switzerland) for 7 min.

MIRU-VNTR analysis

5 µl of the crude extract obtained after boiling the subcultured isolates were used as a template for the VNTR-MIRU analysis. We applied the 15-loci set (22) and the amplified products were run at 45V for 17.30h in a MS8 2% agarose gel (Pronadisa, Madrid, Spain). The size of the fragments was calculated using the ChemiDoc system (BioRad, Hercules, California, USA) and the Diversity database (BioRad), using a 100bp ladder (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) as a molecular weight marker. The number of repeats in each locus was calculated by applying the corresponding conversion table.

MIRU-VNTR allows a rapid identification of polyclonal infection by the simultaneous detection of more than one amplification product for the specific locus/i in which the MTB strains or clonal variants show differences.

INFECTIVITY CHARACTERIZATION OF MTB STRAINS

Cell cultures

The human promonocytic cell line THP-1 was obtained from the American Type Culture Collection (TIB-202; Manassas, VA). Cell cultures were maintained in modified RPMI 1640 + L-glutamine (Gibco, BRL) supplemented with 10% FBS (Biochrom AG), 10 mM HEPES and 50 µg/ml gentamicin (Gibco, BRL); cultures were maintained at $7-10 \times 10^5$ cells/ml and incubated at 37° C in 5% CO₂ in a humidified incubator. THP-1 cells were differentiated as adherent macrophages by the addition of 200 nM PMA (Sigma) for 3 days at 37° C in 5% CO₂.

Cell infections and measurement of bacterial intracellular growth

Cells were infected as described previously (24) with slight modifications. Briefly, differentiated THP-1 cells, seeded in 24-well flat-bottom tissue culture plates, were washed and the medium was replaced to remove PMA and gentamicine 2h before the addition of bacteria. Cells were infected with a multiplicity of infection of 2-10 bacteria per cell and incubated for 3h at 37° C in 5% CO₂. After incubation, monolayers were thoroughly washed with PBS to remove extracellular bacteria and fresh medium was added. To evaluate the bacterial growth of the strains, supernatants were aspirated and monolayers were lysed with 0.5% Nonidet P40 (Roche) at 3h, 1, 4 and 7 days after infection. Serial 10-fold dilutions of cellular lysates were plated on Middlebrook 7H11 plates, incubated for 3 weeks at 37° C in 5% CO₂ and colonies were counted.

Cytokine analysis

Culture supernatants from infected THP-1 cells were harvested at 3h and 1, 4 and 7 days post-infection, frozen at -70°C and assayed with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences) to measure the tumor necrosis factor alpha (TNF-α) and interleukin 10 (IL-10) levels.

Statistical analysis

For each of the 6 subjects, intracellular growth and cytokine production were measured three times in separate analysis for both first and second tuberculosis clinical episode strain. Due to the low number of samples, Wilcoxon signed-rank test for paired samples was used to assess differences in growth ratios and in cytokine levels among episodes.

Results:

ANALYSIS OF PATIENTS WITH EXOGENOUS REINFECTION BY MTB

Our first aim was to evaluate if patients initially considered to be representatives of exogenous reinfections could actually be cases coinfecting by more than one strain with a different chronological representativeness of the coinfecting strains along the infection.

For this purpose, we first searched for candidates to be representatives of exogenous reinfection among recurrent TB cases. 58 patients with recurrent TB were identified. The difference between episodes ranged from 182 to 2643 days (median: 388). 38 (65.51%) of these patients, with episodes that ranged from 2 to 4, had isolates available for genotyping (Table 1).

We identified 7/38 (18.42 %) cases in which major genotypic differences (involving at least 4 loci) were found between the MTB strains isolated from the sequential episodes, suggesting exogenous reinfections (Table 1). Firstly, in these cases, we took the advantage that MIRU-VNTR offers for a rapid detection of polyclonal infections and we could rule out the existence of coinfecting strains in neither the first nor the recurrent episodes, based on the detection of exclusively one allele in all the 15 loci studied. Secondly, in order to assure that reinfections did not correspond to undetected mixed infections, we refined the analysis searching for coinfecting strains in independent isolates from the same episodes. Unfortunately, additional isolates were available for MIRU-typing only in 2/7 cases, but in both, only a single strain was identified in the different isolates from the same episode (Table 1). These findings indicate that no data were found to support the hypothesis that reinfections could be due to mixed infections by more than one MTB strain, which were differentially represented along the infection.

The analysis of the recurrent cases also led us to the identification of 3 additional cases in which subtle differences (involving a single locus) were found between the strains involved in the sequential isolates, suggesting a microevolution phenomenon from a parental strain (Table 1). The same methodological procedure applied for the analysis of the representatives of exogenous reinfection was applied to the microevolution candidates. Now, our aim was to evaluate if after its appearance, the

new clonal variants generated could coexist or not with their parental strains. The simultaneous presence of clonal variants was not observed and only one of the two clonal variants was detected in each of the episodes analyzed, even for those cases in which more than one isolate per episode were available (Table 1).

INFECTIVITY CHARACTERIZATION OF MTB ISOLATES FROM PATIENTS WITH CLONALLY COMPLEX INFECTIONS

Four pairs of MTB strains isolated from four patients with exogenous reinfection (patients 10, 19, 21, 34) were selected for infectivity analysis. Two additional pairs of clonal variants isolated from two patients showing a microevolution phenomenon between the first and the recurrent episode were also included (patients 11, 37) (Table 1)

Intracellular growth of the selected MTB strains in THP-1 cells

We first screened for potential differences in infectivity between the strains isolated from the first and second episodes of patients with reinfection/microevolution and no marked differences were found (Figure 1). When comparing the median of the growth rate of all the strains isolated from the first episode to that for the strains isolated from the second episodes, no differences were found (z-value 0.34). If each patient was analyzed separately, in two cases from the reinfection group (patients 21 and 34), differences in growth rates were recorded, with higher values for the strains isolated from the first episode. No differences were detected for the representatives of microevolution.

IL-10 production by THP-1 infected by MTB

IL-10 levels were measured at 3h, 1, 4 and 7 days after infection. For each time point, the median of the IL-10 levels produced by THP-1 infected by the set of strains isolated from the first episodes was compared with the median of the IL-10 levels produced by THP-1 infected by the set of strains isolated from the second episodes and no differences were found. When the results obtained for each patient were compared separately, in patients 10 and 37 higher levels of IL-10 were observed after infection by strains from the first episodes. These differences were recorded at days 4 and 7 in patient 10, and at day 4 in patient 37 (Figure 2). Patient 10 corresponded to a

representative of exogenous reinfection, while patient 37 corresponded to a representative of microevolution.

TNF-a production by THP-1 infected by MTB

TNF-a levels were also measured at 3h, 1, 4, and 7 days after infection and the same comparisons as those performed for IL-10 were also performed for TNF-a. In the first case (comparison between the medians of the TNF-a levels detected in the first and in the second episodes), no differences were observed. When the results obtained for each pair of strains isolated from each patient were compared separately, in patients 34 and 37, higher levels of TNF-a were detected for the THP-1 infected by the MTB strains isolated from the first episode for all the time-points analyzed. However, in patient 21, the highest levels of TNF-a were observed in the THP-1 infected by the strain isolated from the second episode, at 3h and day 1 (Figure 3). Patients 21 and 34 corresponded to representatives of exogenous reinfection and patient 37 corresponded to a representative of microevolution.

Discussion

The application of DNA fingerprinting tools to the refined analysis of clinical MTB isolates has allowed us to improve the detection of infections involving more than one strain. The application of these techniques to the study of TB recurrences has revealed examples of exogenous reinfection with a MTB strain different from the one isolated in the first episode. In addition to reinfections, infections involving more than one MTB strain/clonal variant simultaneously (1, 5) (11) have also been reported. In certain contexts with a high risk of overexposure, the application of a refined methodology by analyzing several serial isolates from each episode, has allowed the identification of a higher percentage of TB cases with mixed infections than initially expected (19)

Despite these clonally complex events are now become gradually accepted, there are only few studies specifically focused on the analysis of their relative importance and most of them lie on difficult or cumbersome methodological approaches, such as the interpretation of low intensity bands in the RFLP-patterns (6), or the analysis of multiple independent colonies (13). Recently, MIRU-VNTR, a new PCR-based technique, has shown to be efficient and suitable for a rapid and easy identification of clonal complexity phenomena (9). The application of this PCR-based technique, together with the analysis of several serial isolates per patient have been recommended in order to improve the detection of clonal heterogeneity and to minimize the understimation of clonally complex infections (19)

Taking together the observations related to reinfections and those referring to mixed infections, we first aimed to analyze whether exogenous reinfections could correspond indeed to mixed infections with a different chronological representation of strains along the sequential episodes of a recurrent TB case. In this sense, some authors have speculated about the possibility of undetected mixed infections being responsible for a relapse after an apparent “curative” treatment (17), but no major studies have been conducted to prove this hypothesis.

Clonal heterogeneity between the MTB isolates from the first and the recurrent episodes was found at a high frequency (26.3%) for the recurrent cases studied. In 18.46% of the recurrent cases, major genotypic differences were found between the isolates, suggesting exogenous reinfections. This percentage, although high, is similar to the study of Bandera et al., in which 16% of recurrences due to exogenous

reinfection were also observed in an area with low incidence of TB. In this sample of representatives of reinfection we searched for the presence of more than one MTB strain in any of the episodes. We took advantage of the ability of MIRU-VNTR to directly identify cases infected by more than one strain and enriched our screening by analyzing more than one isolate per episode, when available. This last refinement tried to minimize the fact that not all the infecting MTB strains are necessarily equally represented in independent clinical specimens (18). In all cases, only a single strain was detected in each episode. Based on these findings, the hypothesis that an exogenous reinfection could correspond to undetected polyclonal infections with a different chronological representativeness of coinfecting strains could not be proved. However, we cannot completely rule out the possibility of undetected polyclonal infections, since we were not able to genotype more than one isolate per episode in all cases. It could also be possible that a mixed infection had remained undetected by MIRU, although rather improbable, since the percentage of one of the strains should be lower than 1% (9). Despite these limitations, to the best of our knowledge, this is the first study in which the hypothesis of possible misassignments in the analysis of recurrences due to undetected polyclonal infections has been experimentally abandoned.

Appart from the reinfection cases, our analysis of recurrent cases allowed us to identify another interesting set of patients, those in which MTB clonal variants with subtle genotypic differences could be isolated from the sequential episodes. Again, only one of the variants could be identified in each of the episodes, suggesting some kind of advantage leading to the displacement of the parental strain.

In most cases, the phenomenon of exogenous reinfection has been observed in settings with either a high incidence of TB (8, 20, 21, 26) or where the risk of overexposure is increased (5). Moreover, several of these studies have shown that immunocompromised cases are at a higher risk for exogenous reinfection (21). All these studies have led to the assumption that exogenous reinfection is associated to clinical and socio-epidemiological factors, which would be in accordance to the statement made by Vynnycky et. al about how the detection of exogenous reinfection in the analysis of TB recurrences increases in parallel with the risk of infection (27).

However, examples of exogenous reinfection in both HIV-negative patients and settings with a low incidence of TB have also been found (2, 4, 12), even in circumstances where it is not expected, such as in those patients that did not adhere to therapy along their first episode. These findings could suggest that certain bacterial

factors might also play a role in TB exogenous reinfections, although only one study has suggested this possibility (12).

For this reason, the next aim of this study was to evaluate whether, in addition to socioepidemiological factors, bacterial factors could also be contributing to the phenomenon of exogenous reinfection. We also considered of special interest to analyze possible differences in the infectivity of the different clonal variants detected in certain recurrent cases, since the generation of a clonal variant from a parental MTB strain has been suggested to be a mechanism of adaptation to the new host environment (6) and subtle genetic variations have been found to be responsible of modifications in the ability to infect different tissues (11). Moreover, a previous study of our group found a correlation between both the *in vivo* and *in vitro* infectivity of MTB strains and their efficiency to infect extrapulmonary sites (10). Apart from these findings, the specific role that differences in virulence could play in reinfection or in clonally complex infections in general has not been explored in depth. For this reason, we performed a characterization of the *in vitro* infectivity of the MTB strains involved in some of the clonally complex infections detected in our first approach. In this characterization we used the model of infection with the THP-1 cell line, since it has been shown to be suitable for the analysis of MTB intracellular growth (24). Besides, this model has shown to be successful in identifying different intracellular growth rates and cytokines production in the cells infected by MTB strains with different transmission dynamics (23, 25).

When we compared the median of the growth rate values for the representative strains of exogenous reinfections involved in the first episodes to that of the strains involved in the recurrent episode, no differences were found. However, when we analyzed each pair of strains isolated from each single patient independently, differences were observed in 2 cases from the exogenous reinfection group (patients 21 and 34) and, in both cases, the strains involved in the first episode showed a higher growth rate. When we analyzed the medians of the levels of cytokines in the supernatants from the cells infected by the strains involved in first episodes compared to those from second episodes, no differences were found again. If we look at the TNF- α and IL-10 levels of the two pairs of strains showing differences in the growth rates, differences in the TNF- α production were observed in both cases. In patient 21 lower levels of TNF- α were detected in the second episode. In this sense, the ability to induce the production of TNF- α by the infected cells has shown to be characteristic of “slow-

growth” phenotypes, since the initial control of the infection by MTB depends on macrophage activation, which includes the production of this cytokine by the infected cells (25). Previous studies of Theus et al. have shown a strongly correlation between either a suppression of TNF- α or an early production of IL-10 (or both) and a higher growth rate of certain MTB strains in THP-1 cells (23, 25), but in our study none of these behaviors were observed. However, in patient 34, the highest levels of TNF- α were detected in the first episode along the infection, which suggest that, in this case, other mechanisms, different from the ability to reduce the production of this cytokine, could explain the higher growth rate observed in the strain belonging to the first episode.

For the clonal variants involved in the cases of microevolution no differences in the intracellular replication were found. In the analysis of cytokine production differences in TNF- α levels were observed in THP-1 infected by MTB strains isolated from patient 37, with higher levels detected in cells infected by the clonal variant from the first episode along the infection. The ability to contain the production of TNF- α might be an advantage for the clonal variant detected in the second episode. This fact could explain why, once this second clonal variant emerges, the initial clone is not detected.

Although limited by the small number of strains assayed, we could conclude that no bacterial factors, such as a higher infectivity or an ability to control the host immune response, seem to be related to reinfection/microevolution events. We must take into consideration the fact that most of the patients (7/10) showing clonal heterogeneity in this study where HIV-positive and immunocompromised persons are at a higher risk for exogenous reinfection (21), so this could suggest that the immunocompromised status of our hosts could be biasing the lack of association between bacterial factors and reinfection/microevolution.

Despite when comparing the whole two groups of MTB strains no differences in the *in vitro* infectivity were observed, some differences in the growth rates of two pairs were found. In both cases the strains involved in the first episode showed a higher intracellular growth rate and the time between the first and the recurrent episode was relatively short. In one of the involved patients, no risk factors for developing TB were recorded. A possible explanation for this case, although rather speculative, is that the immune status of the host appeared to be very compromised after infection with the first MTB strain, making easier a reinfection by a new strain, even when the infectivity of

the latter strain was lower. This possibility has also been suggested by other authors (7) and it could explain the short time passed between the first and the second episode. Therefore, it is possible that, in this case, certain bacterial factors, accounting for the ability to reduce the host response could mean certain facility for being re-infected when being exposed to a new MTB strain. Further studies will be required in order to investigate this hypothesis.

Our results suggest that, in a context of low incidence of TB, the possibility of misassignments of exogenous reinfections, due to a polyclonal infection non-detected by the standard analytical procedures, is rather improbable. Besides, in our context, the role of certain bacterial factors, such as infectivity, in clonally complex recurrences could not be proved.

Acknowledgements

We are indebted to Thomas O'Boyle for proofreading and editing the manuscript. We are grateful to Beatriz Pérez for the statistical analysis. A.M. is the recipient of a grant from the Comunidad de Madrid, cofinanced by the European Social Fund (Order no. 5297/2006). This study was partially financed by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 02/0572, 02/1307, 02/0882, 030654; 060882) and by Instituto de Salud Carlos III (CIBER Enfermedades Respiratorias CB06/06/0058; Spanish Network for the Research in Infectious Diseases REIPI RD06/0008).

Figures and Tables

Table 1: Characteristics of the patients analyzed and genotypes obtained for each isolate after the MIRU-VNTR typing. Those cases in which clonal complexity was detected are highlighted in grey. In bold are those loci in which the isolates shown differences in their MIRU-types. The lack of allelic value in a MIRU locus indicates that no amplified product was obtained.

Figure 1: *In vitro* intracellular growth rates, median values and range, for the two isolates from the sequential episodes of each patient.

Figure 2: IL-10 levels, medians and ranges, produced by THP-1 cells infected by the MTB strains isolated from each patient. IL-10 levels obtained in non-infected controls are shown as reference.

Figure 3: TNF- α levels, medians and ranges, produced by THP-1 cells infected by the MTB strains isolated from each patient. TNF- α levels obtained in non-infected controls are shown as reference.

1. **Baldeviano-Vidalon, G. C., N. Quispe-Torres, C. Bonilla-Asalde, D. Gastiaburu-Rodriguez, J. E. Pro-Cuba, and F. Llanos-Zavalaga.** 2005. Multiple infection with resistant and sensitive *M. tuberculosis* strains during treatment of pulmonary tuberculosis patients. *Int J Tuberc Lung Dis* **9**:1155-60.
2. **Bandera, A., A. Gori, L. Catozzi, A. Degli Esposti, G. Marchetti, C. Molteni, G. Ferrario, L. Codecasa, V. Penati, A. Matteelli, and F. Franzetti.** 2001. Molecular epidemiology study of exogenous reinfection in an area with a low incidence of tuberculosis. *J Clin Microbiol* **39**:2213-8.
3. **Barczak, A. K., P. Domenech, H. I. Boshoff, M. B. Reed, C. Manca, G. Kaplan, and C. E. Barry, 3rd.** 2005. In vivo phenotypic dominance in mouse mixed infections with *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Infect Dis* **192**:600-6.
4. **Caminero, J. A., M. J. Pena, M. I. Campos-Herrero, J. C. Rodriguez, O. Afonso, C. Martin, J. M. Pavon, M. J. Torres, M. Burgos, P. Cabrera, P. M. Small, and D. A. Enarson.** 2001. Exogenous reinfection with tuberculosis on a European island with a moderate incidence of disease. *Am J Respir Crit Care Med* **163**:717-20.
5. **Chaves, F., F. Dronda, M. Alonso-Sanz, and A. R. Noriega.** 1999. Evidence of exogenous reinfection and mixed infection with more than one strain of *Mycobacterium tuberculosis* among Spanish HIV-infected inmates. *Aids* **13**:615-20.
6. **de Boer, A. S., K. Kremer, M. W. Borgdorff, P. E. de Haas, H. F. Heersma, and D. van Soolingen.** 2000. Genetic heterogeneity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates reflected in IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns as low-intensity bands. *J Clin Microbiol* **38**:4478-84.
7. **du Plessis, D. G., R. Warren, M. Richardson, J. J. Joubert, and P. D. van Helden.** 2001. Demonstration of reinfection and reactivation in HIV-negative autopsied cases of secondary tuberculosis: multilesional genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* utilizing IS 6110 and other repetitive element-based DNA fingerprinting. *Tuberculosis (Edinb)* **81**:211-20.
8. **Fitzpatrick, L. K., A. Okwera, R. Mugerwa, R. Ridzon, J. Ehiner, and I. Onorato.** 2002. An investigation of suspected exogenous reinfection in tuberculosis patients in Kampala, Uganda. *Int J Tuberc Lung Dis* **6**:550-2.
9. **García de Viedma, D., N. Alonso Rodriguez, S. Andres, M. J. Ruiz Serrano, and E. Bouza.** 2005. Characterization of clonal complexity in tuberculosis by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing. *J Clin Microbiol* **43**:5660-4.
10. **García de Viedma, D., G. Lorenzo, P. J. Cardona, N. A. Rodriguez, S. Gordillo, M. J. Serrano, and E. Bouza.** 2005. Association between the infectivity of *Mycobacterium tuberculosis* strains and their efficiency for extrapulmonary infection. *J Infect Dis* **192**:2059-65.
11. **García de Viedma, D., M. Marin, S. Andres, G. Lorenzo, M. J. Ruiz-Serrano, and E. Bouza.** 2006. Complex clonal features in a mycobacterium tuberculosis infection in a two-year-old child. *Pediatr Infect Dis J* **25**:457-9.
12. **García de Viedma, D., M. Marin, S. Hernangomez, M. Diaz, M. J. Ruiz Serrano, L. Alcalá, and E. Bouza.** 2002. Tuberculosis recurrences: reinfection plays a role in a population whose clinical/epidemiological characteristics do not favor reinfection. *Arch Intern Med* **162**:1873-9.

13. **García de Viedma, D., M. Marin, M. J. Ruiz Serrano, L. Alcalá, and E. Bouza.** 2003. Polyclonal and compartmentalized infection by *Mycobacterium tuberculosis* in patients with both respiratory and extrapulmonary involvement. *J Infect Dis* **187**:695-9.
14. **Kaplan, G., F. A. Post, A. L. Moreira, H. Wainwright, B. N. Kreiswirth, M. Tanverdi, B. Mathema, S. V. Ramaswamy, G. Walther, L. M. Steyn, C. E. Barry, 3rd, and L. G. Bekker.** 2003. *Mycobacterium tuberculosis* growth at the cavity surface: a microenvironment with failed immunity. *Infect Immun* **71**:7099-108.
15. **Manca, C., L. Tsenova, C. E. Barry, 3rd, A. Bergtold, S. Freeman, P. A. Haslett, J. M. Musser, V. H. Freedman, and G. Kaplan.** 1999. *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 induces a more vigorous host response in vivo and in vitro, but is not more virulent than other clinical isolates. *J Immunol* **162**:6740-6.
16. **Martin, A., M. Herranz, M. J. Serrano, E. Bouza, and D. García de Viedma.** 2007. Rapid clonal analysis of recurrent tuberculosis by direct MIRU-VNTR typing on stored isolates. *BMC Microbiol* **7**:73.
17. **Palomino, J. C., Leao, S. C., Ritacco, V.** 2007. *Tuberculosis 2007. From Basic Science to Patient Care.*
18. **Post, F. A., P. A. Willcox, B. Mathema, L. M. Steyn, K. Shean, S. V. Ramaswamy, E. A. Graviss, E. Shashkina, B. N. Kreiswirth, and G. Kaplan.** 2004. Genetic polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with chronic multidrug-resistant tuberculosis. *J Infect Dis* **190**:99-106.
19. **Shamputa, I. C., L. Jugheli, N. Sadradze, E. Willery, F. Portaels, P. Supply, and L. Rigouts.** 2006. Mixed infection and clonal representativeness of a single sputum sample in tuberculosis patients from a penitentiary hospital in Georgia. *Respir Res* **7**:99.
20. **Shen, G., Z. Xue, X. Shen, B. Sun, X. Gui, M. Shen, J. Mei, and Q. Gao.** 2006. The study recurrent tuberculosis and exogenous reinfection. Shanghai, China. *Emerg Infect Dis* **12**:1776-8.
21. **Sonnenberg, P., J. Murray, J. R. Glynn, S. Shearer, B. Kambashi, and P. Godfrey-Faussett.** 2001. HIV-1 and recurrence, relapse, and reinfection of tuberculosis after cure: a cohort study in South African mineworkers. *Lancet* **358**:1687-93.
22. **Supply, P., C. Allix, S. Lesjean, M. Cardoso-Oelemann, S. Rusch-Gerdes, E. Willery, E. Savine, P. de Haas, H. van Deutekom, S. Roring, P. Bifani, N. Kurepina, B. Kreiswirth, C. Sola, N. Rastogi, V. Vatin, M. C. Gutierrez, M. Fauville, S. Niemann, R. Skuce, K. Kremer, C. Locht, and D. van Soolingen.** 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **44**:4498-510.
23. **Theus, S. A., M. D. Cave, K. Eisenach, J. Walrath, H. Lee, W. Mackay, C. Whalen, and R. F. Silver.** 2006. Differences in the growth of paired Ugandan isolates of *Mycobacterium tuberculosis* within human mononuclear phagocytes correlate with epidemiological evidence of strain virulence. *Infect Immun* **74**:6865-76.
24. **Theus, S. A., M. D. Cave, and K. D. Eisenach.** 2004. Activated THP-1 cells: an attractive model for the assessment of intracellular growth rates of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Infect Immun* **72**:1169-73.

25. **Theus, S. A., M. D. Cave, and K. D. Eisenach.** 2005. Intracellular macrophage growth rates and cytokine profiles of *Mycobacterium tuberculosis* strains with different transmission dynamics. *J Infect Dis* **191**:453-60.
26. **van Rie, A., R. Warren, M. Richardson, T. C. Victor, R. P. Gie, D. A. Enarson, N. Beyers, and P. D. van Helden.** 1999. Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N Engl J Med* **341**:1174-9.
27. **Vynnycky, E., and P. E. Fine.** 1997. The natural history of tuberculosis: the implications of age-dependent risks of disease and the role of reinfection. *Epidemiol Infect* **119**:183-201.
28. **Warren, R. M., T. C. Victor, E. M. Streicher, M. Richardson, N. Beyers, N. C. Gey van Pittius, and P. D. van Helden.** 2004. Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen. *Am J Respir Crit Care Med* **169**:610-4.

Table 1

Patient	Sex	Risk factors	Adherence	Episode	Days	Isolates genotyped	Type of isolate	MIRU-type
1	Female	No	No	1		1	Sputum	252353232232425
				2	568	1	Sputum	252353232232425
				3	469	1	Sputum	252353232232425
				4	356	1	Sputum	252353232232425
2	Male	IVDU	No	1		1	Sputum	245423342123217
				2	762	1	Sputum	245423342123217
3	Male	No	Not available	1		1	Sputum	233543242212427
				2	870	1	Sputum	233543242212427
4	Male	HIV ⁺ , IVDU, Prison	No	1		1	Sputum	253533_33423533
				2	225	1	Urine	253533_33423533
5	Male	No	No	1		1	Sputum	253533333433426
				2	182	1	Sputum	253533333433426
				3	253	1	Sputum	253533333433426
				4	310	1	Sputum	253533333433426
6	Male	Alcoholism	Not available	1		1	Sputum	25442342221243
				2	993	1	Sputum	25442342221243
7	Male	Alcoholism	No	1		1	Sputum	25453342221243
				2	1120	1	Sputum	25453342221243
8	Male	HIV ⁺ , IVDU	No	1		1	Sputum	2'52453242232225
				2	753	1	Sputum	2'52453242232225
				3	567	1	Sputum	2'52453242232225
9	Female	HIV ⁺ , IVDU	Not available	1		1	Sputum	2515_3333433726
				2	714	1	Sputum	Not available
10	Male	HIV ⁺ , IVDU	Not available	1		1	Urine	252433422212437
				2	1367	1	Sputum	2534_3342133137
11	Male	HIV ⁺ , Alcoholism	Not available	1		1	Sputum	2525_3233432425
				2	602	1	Sputum	2523_3233432425
12	Male	HIV ⁺ , Alcoholism, Prison	Not available	1		1	Sputum	253333243232325
				2	1492	2	Sputum	252333243232325
							Sputum	252333243232325
13	Male	No	Not available	1		1	Sputum	2523_3232232_25
				2	863	1	Sputum	2523_3232232_25
14	Male	HIV ⁺ , Alcoholism	Yes	1		1	Sputum	25532314323_525
				2	1888	1	Sputum	255433340211434
				3	327	1	Urine	255433340211434
15	Male	HIV ⁺	Not available	1		1	Sputum	253323422212236
				2	288	1	Sputum	253323422212236
16	Male	Silicosis, Lupus	Yes	1		1	Sputum	252433243443347
				2	1963	1	Sputum	252433243443347
17	Male	HIV ⁺ , IVDU, Hepatitis B, Hepatitis C	Yes	1		1	Sputum	253333242232425
				2	409	1	Blood	253333242232425
18	Male	HIV ⁺ , IVDU, Hepatitis B, Hepatitis C	No	1		1	Sputum	254223422213236
				2	238	1	CSF	254223422213236
19	Male	No	Not available	1		2	Sputum	333333444232416
							Sputum	333333444232416
				2	489	1	Sputum	243433422212434
20	Male	Alcoholism, Tobaccism	Yes	1		1	Sputum	251433542122438
				2	202	1	Sputum	251433542122438
21	Male	No	Not available	1		2	Sputum	263432233431244
							Sputum	263432233431244
				2	263	1	Sputum	252343242232_25
22	Female	Alcoholism, Tobaccism	No	1		1	Sputum	253423422212334
				2	387	1	Sputum	253423422212334
23	Male	VIH ⁺ , Alcoholism	Not available	1		1	Sputum	253423422212437
				2	610	1	Sputum	253423422212437
24	Male	VIH ⁺ , IVDU, Hepatitis B, Hepatitis C	Yes	1		1	Sputum	243433442212424
				2	321	1	Sputum	243433442212424
25	Male	VIH ⁺ , Alcoholism, Homelessness	No	1		1	Sputum	25363323_433635
				2	981	1	Sputum	25353223_333235
26	Male	No	Not available	1		1	Sputum	255433442212334
				2	252	1	Sputum	255433442212334
				3	1203	1	Sputum	255433442212334
27	Female	No	Not	1		1	Sputum	2513_314_232225

Reinfección exógena por *M. tuberculosis*: policlonalidad e infectividad diferencial

			available	2	1036	1	Sputum	354323343222518
28	Male	No	Not available	1		1	Sputum	251323142122234
				2	221	1	Sputum	251323142122234
29	Male	No	Not available	1		1	Sputum	254233242232425
				2	258	1	Sputum	254233242232425
30	Male	HIV ⁺ , IVDU, Hepatitis C	Yes	1		1	Sputum	253533242232425
				2	285	1	Sputum	253533242232425
31	Male	HIV ⁺ , IVDU, Hepatitis B, Hepatitis C	Unkown	1		1	Sputum	251423442122337
				2	312	1	Sputum	251423442122337
32	Female	HIV ⁺ , IVDU, Hepatitis C	No	1		1	Sputum	252343242232325
				2	186	1	Sputum	252343242232325
33	Male	VIH ⁺ , IVDU, Hepatitis B, Hepatitis C, Inprisonment	No	1		1	Sputum	253533233433426
				2	277	1	Sputum	253533233433426
34	Male	HIV ⁺ , IVDU, Alcoholism	No	1		1	Sputum	251423442122337
				2	217	1	Blood	244333043 3 525
35	Male	HIV ⁺ , IVDU, Hepatitis C	Yes	1		1	Sputum	234333242232325
				2	222	1	Sputum	234333242232325
36	Male	Alcoholism, Tobaccism, Hepatitis C	No	1		1	Sputum	252433342123237
				2	880	1	Sputum	252433342123237
37	Male	HIV ⁺ , Multidrug User	No	1		1	Sputum	261423342132235
				2	425	2	Sputum	261423142132235
							Sputum	261423142132235
38	Male	No	Yes	1		1	Sputum	351433233423436
				2	1400	1	Sputum	351433233423436

Figure 1

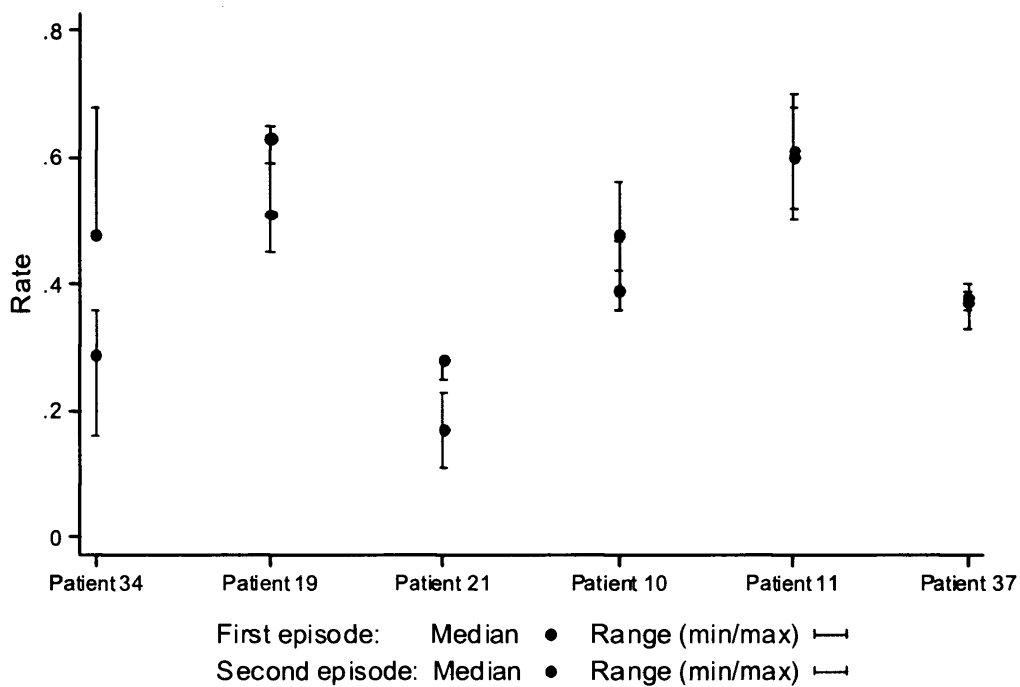


Figure 2

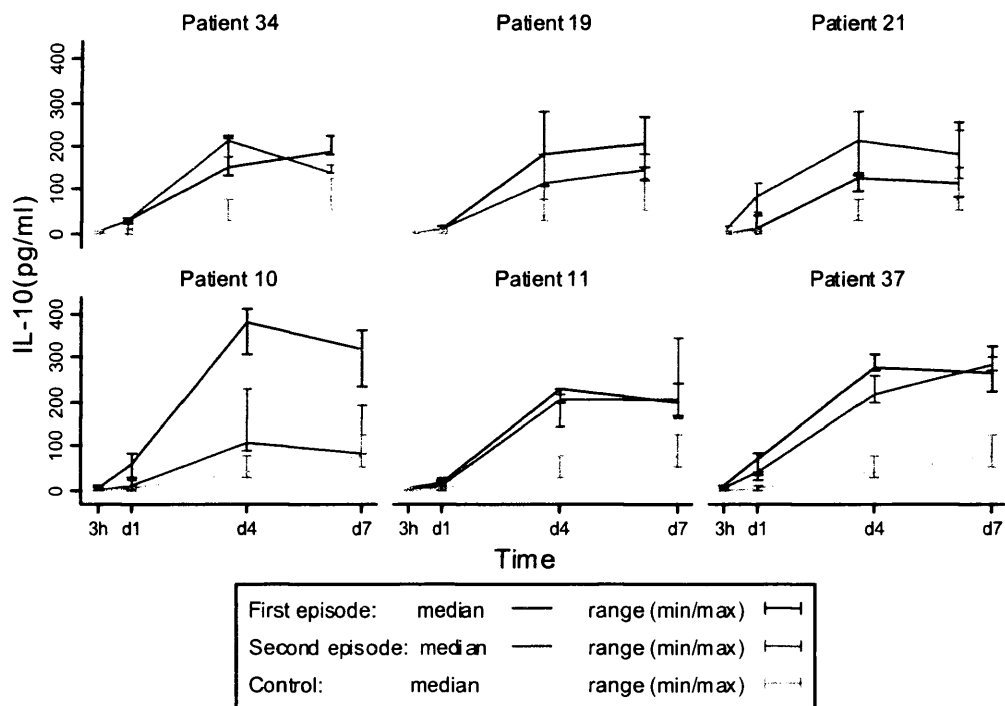
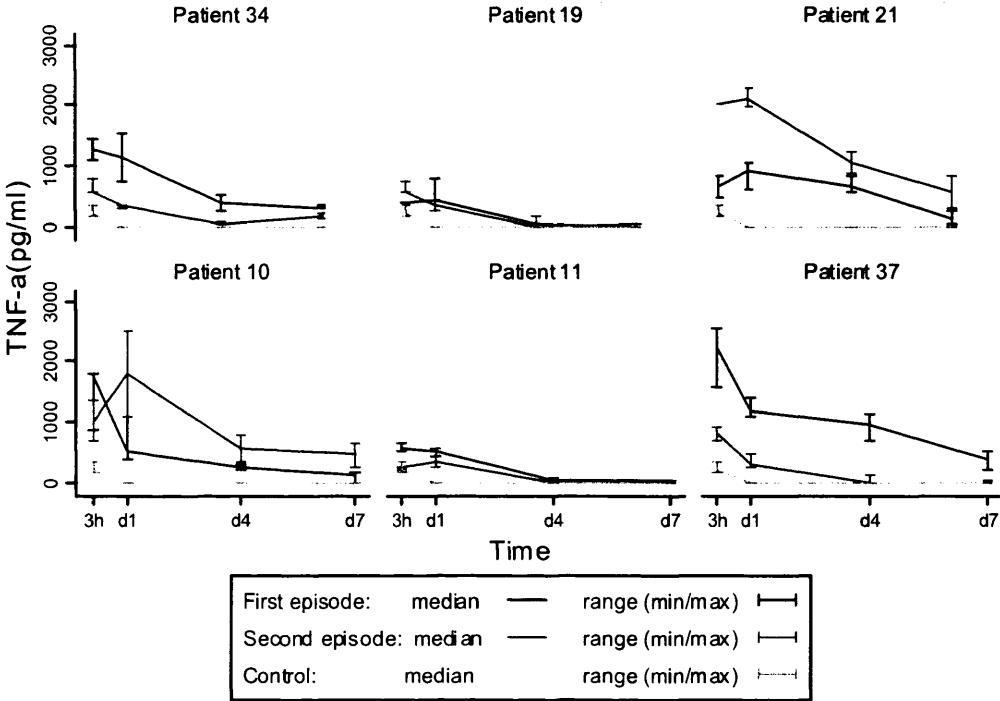


Figure 3



OBJETIVO 6:

Caracterizar desde un punto de vista molecular, epidemiológico e infectivo una cepa de *M. tuberculosis* prevalente en Madrid.

“Caracterización molecular, epidemiológica e infectiva de una cepa de *M. tuberculosis* prevalente en Madrid”.

Publicado en *Clinical Microbiology and Infection*, Diciembre 2007.

RESUMEN

La cepa más prevalente en Madrid es la cepa 5, que se aisló de un total de 45 casos de tuberculosis durante el período 1997-2004. Esta cepa se analizó por los tres marcadores genéticos empleados habitualmente para el genotipado de *M. tuberculosis* (IS6110-RFLP, Spoligotipado y MIRU-VNTR), observándose que se trata de una cepa muy homogénea genéticamente, ya que, a excepción de un caso que presentó diferencias en su spoligotipo y otro en el que se observó la presencia simultánea de dos variantes clonales de esta cepa, el resto de los casos compartieron el mismo perfil genotípico por los tres marcadores.

Esta cepa no es exclusiva de España, ya que su spoligotipo (patrón ST20) se ha encontrado en la base internacional de datos SITVIT asociado a aislados procedentes de diversos países.

En los pacientes infectados por la cepa 5, se ha observado con mayor frecuencia coinfección por VIH. Además, entre estos pacientes era más frecuente encontrar casos autóctonos y que habían permanecido en prisión. En un modelo de infección celular *in vitro* con células THP-1, esta cepa no mostró una infectividad incrementada.

of pathogenicity island-like domains in relation to antibiotic resistance profiles among *Escherichia coli* urosepsis isolates. *J Antimicrob Chemother* 2006; **58**: 748–751.

16. Moreno E, Prats G, Sabate M, Perez T, Johnson JR, Andreu A. Quinolone, fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2006; **57**: 204–211.
17. Duriez P, Clermont O, Bonacorsi S *et al*. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology* 2001; **147**: 1671–1676.
18. Soto SM, Jimenez de Anta MT, Vila J. Quinolones induce partial or total loss of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* by SOS-dependent or -independent pathways, respectively. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 649–653.
19. Johnson JR, Johnston B, Kuskowski MA, Colodner R, Raz R. Spontaneous conversion to quinolone and fluoroquinolone resistance among wild-type *Escherichia coli* isolates in relation to phylogenetic background and virulence genotype. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 4739–4744.
20. Martínez-Martínez L, Fernández F, Perea EJ. Relationship between haemolysis production and resistance to fluoroquinolones among clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 1999; **43**: 277–279.

RESEARCH NOTE

Molecular, epidemiological and infectivity characterisation of a *Mycobacterium tuberculosis* strain prevalent in Madrid

A. Martín¹, F. Chaves², J. Iñigo³, M. Alonso¹, C. Sola¹, N. Rastogi⁴, M. J. Ruiz Serrano¹, E. Palenque², E. Bouza¹ and D. García de Viedma¹

¹Clinical Microbiology and Infectious Diseases Service, Gregorio Marañón Hospital, ²Microbiology Service, Doce de Octubre Hospital, ³Consejería de Sanidad, Madrid, Spain and ⁴Unité de la Tuberculose et des Mycobactéries, Institut Pasteur de Guadeloupe, Guadeloupe, France

Corresponding author and reprint requests: D. García de Viedma, Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital Gregorio Marañón, C/Dr Esquerdo 46, 28007 Madrid, Spain
E-mail: dgvedma@microb.net

ABSTRACT

The most prevalent strain of *Mycobacterium tuberculosis* in Madrid, Spain (strain 5) was recovered from 45 cases between 1997 and 2004 and showed a highly homogeneous genetic composition. This strain was not exclusive to Spain, and its spoligo-typing signature (ST20) was found in entries from different countries in the SITVIT1 database. Patients infected with strain 5 were more frequently positive for human immunodeficiency virus and autochthonous, and had been in prison more frequently, but strain 5 did not show increased infectivity in an in-vitro model of infection.

Keywords Epidemiology, infectivity, *Mycobacterium tuberculosis*, spoligotyping, ST20

Original Submission: 5 March 2007; **Revised Submission:** 29 May 2007; **Accepted:** 28 June 2007

Clin Microbiol Infect 2007; **13**: 1210–1213
10.1111/j.1469-0691.2007.01820.x

Molecular tools allow different *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) strains circulating in a population to be distinguished, with fingerprint data obtained in molecular epidemiology programmes [1] making it possible to identify prevalent strains or genetic families that are over-represented in certain settings [2,3]. In Spain, there has been a sharp increase in the number of cases of tuberculosis among immigrants [4]. It is assumed that some of these patients import MTB strains from their countries of origin, and that such strains could have an impact on the profile of strains circulating in the host population, considering the high rate of transmission between the autochthonous and immigrant populations in this area [4].

Molecular fingerprinting tools have been used in Madrid, Spain since 1997 [5]. The MTB isolates from nine urban districts (1 459 232 inhabitants) in Madrid were genotyped. Isolates from all nine districts were genotyped during 2002–2004, and isolates from five districts during 1997–2001. In total, 1207 MTB isolates were analysed by IS6110 restriction fragment length polymorphism [6], yielding 867 different genotypes, with 455 (37.7%) isolates grouped in 115 clusters; 51.3% of the clusters included two isolates, and only 9.6% of the clusters included more than six isolates. Nevertheless, some large clusters were detected, with the four largest clusters corresponding to strains 5 (45 cases), 2, 8 and 38 (20 cases each). Strain 5 was

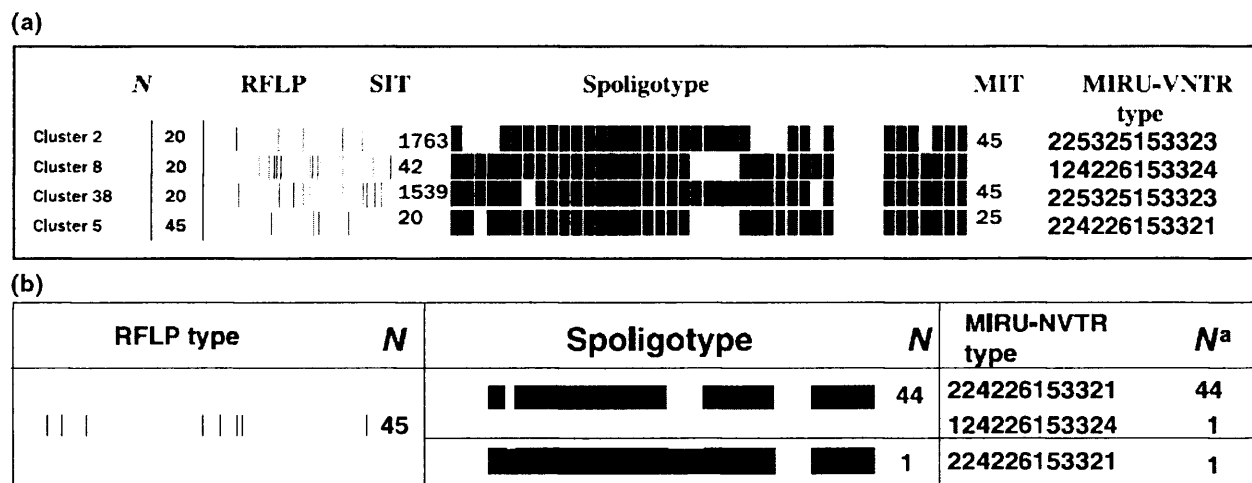


Fig. 1. Molecular genotyping patterns of: (a) the four strains of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) prevalent in Madrid; (b) the 45 strain 5 isolates of MTB. N, number of cases infected by the strains; spoligotypes and mycobacterial interspersed repetitive unit variable number tandem repeats (MIRU-VNTR) types are indicated with their international designations according to the SITVIT1 database (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr/SITVIT>). RFLP, restriction fragment length polymorphism. ^aOne case was co-infected by two variants with different MIRU-VNTR types.

isolated from the highest number of cases (3.7% of the total) and was therefore selected for in-depth characterisation. This strain showed an eight-band restriction fragment length polymorphism pattern (Fig. 1) and was isolated in all but one of the years of the study. Of 45 cases infected with strain 5, 37 were males, 18 were positive for human immunodeficiency virus, two were foreign-born, 12 were diagnosed while in prison, and ten were intravenous drug users.

Strain 5 was detected previously during 1993–1994, at which time it was predominant among three strains responsible for the highest number of cases in a prison population [7]. In the present study, strain 5 still persisted after 13 years, while the two other strains had declined in importance, suggesting that strain 5 is favoured over other strains.

Additional spoligotyping [8] and mycobacterial interspersed repetitive units variable number tandem repeats (MIRU-VNTR) analysis [9] revealed a highly robust and homogeneous genetic profile, with all but one of the patients infected by isolates sharing identical genotypes (ST20: 67777607760771, which is a feature of the LAM-superfamily), and all isolates sharing identical MIRU-VNTR types (MIT25: 224226153321; Fig. 1). In one of the patients, MIRU-VNTR analysis detected a co-infection with two clonal variants,

differing by one and three repeats in two loci, but indistinguishable by restriction fragment length polymorphism or spoligotyping (Fig. 1b). This genotypic homogeneity also suggests that strain 5 is somehow favoured, which may ensure its genetic homogeneity, or that this strain was only introduced to Spain recently and has not yet diverged genetically. In contrast, isolates of the three other prevalent strains (strains 2, 8 and 38) frequently showed differences among their spoligotypes (data not shown).

Features linked to clustering in Madrid are an age of <35 years and intravenous drug use [4,5,7]. Compared with cases infected by other strains, Spanish birth, human immunodeficiency virus infection and prison stay were associated significantly with infection by strain 5 ($p < 0.05$). Twelve cases infected with strain 5 were from the same district, but epidemiological links were found for only three pairs of brothers. Evidence of strain 5 infecting immigrants was detected, suggesting that immigrants could become infected after their arrival by strains that are prevalent in the host country.

In order to establish whether strain 5 was specific to Spain, the SITVIT1 database (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr/SITVIT>) was searched for strains sharing the same spoligotype (ST20). Unlike the Madrid 1 and 2 strains [10], the spoligotype

Table 1. Bacterial growth in activated THP-1 cells

Strain	Days post-infection	Growth ratio ^a	Comparative growth with H37Rv ^b	Comparative growth with H ^b
A (strain 5)	d1	3.11	1.22	1.60
	d4	10.66	0.59	2.42
	d7	15.50	0.27	2.28
H (orphan strain)	d1	1.73	0.69	
	d4	4.40	0.26	
	d7	6.80	0.13	
H37Rv	d1	2.57		1.49
	d4	17.94		4.06
	d7	52.58		7.74

^aRatio between the number of CFUs obtained in the post-infection analysis (1 day, 4 days or 7 days) and the number of CFUs obtained immediately following infection (3 h).

^bComparative growth was calculated by dividing the growth rates of the A and H strains by the value of the H37Rv reference virulent strain, or by dividing the growth rates of the A and H37Rv strains by the value for the orphan H strain.

signature of strain 5 was not specific to Spain, with 378 cases matching ST20 reported from 37 countries other than Spain. Of these, strain 5 was over-represented in the database entries from Brazil (7%), Portugal (12%), Venezuela (6%), Haiti (6%) and Namibia (15%).

The infectivity of a representative of strain 5 was assayed in comparison with the virulent reference strain H37Rv, and with a representative 'orphan' strain (isolated from only one patient during the same study period), by measuring its intracellular growth in an in-vitro infection model using the human promonocytic cell line THP-1 activated with phorbol 12-myristate 13-acetate [11,12]. Cell monolayers were infected in duplicate with 0.5–5 bacteria/cell, prepared from strains that had been passaged on fewer than four occasions after primary isolation. After incubation, the monolayers were washed thoroughly with phosphate-buffered saline to remove extracellular bacteria, and fresh medium was then added. To evaluate bacterial growth, the supernatants were aspirated and monolayers were lysed after 3 h (time 0) and 1, 4 and 7 days after infection. Serial dilutions of cellular lysates were plated on Middlebrook 7H11 plates and colonies were counted (Table 1). The results showed that the growth ratio for strain 5 was superior to that obtained for the orphan strain at the three time-points analysed, indicating a replication advantage for strain 5. However, compared with the virulent reference strain, the growth rate for strain 5 was higher only at the 1-day time-point.

Epidemiological and bacteriological features leading to a high prevalence of specific strains have been observed in other settings. For exam-

ple, in Manitoba, Canada, the prevalent 'type 1' strain seems to have epidemiological links with the native population that could favour its prevalence, although bacterial factors also seem to be involved [13,14]. The present study showed that strain 5 could have higher infectivity compared with other less frequent clinical strains, but that it is not a highly infective clone. More refined genomic or transcriptomic-based approaches may identify specific bacterial features that give a theoretical advantage to this strain, but the in-vitro data currently available suggest that epidemiological factors are mainly responsible for the prevalence of this strain.

Identification of other prevalent strains could help in monitoring changes in the profile of circulating MTB strains, and also in monitoring the epidemiological features associated with ongoing transmission. A panel of marker strains would be extremely useful in countries such as Spain, where the rise in the number of tuberculosis cases in immigrants is currently causing a transformation in the epidemiology of tuberculosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to T. Zozio for analysis using the SITVIT database, and to T. O'Boyle for proofreading and editing the manuscript. A.M. is the recipient of a grant from the Comunidad de Madrid, co-financed by the European Social Fund (Order no. 5297/2006). This study was funded, in part, by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS030654; FIS060882) and by the Instituto de Salud Carlos III (CIBER Enfermedades Respiratorias CB06/06/0058; Spanish Network for the Research in Infectious Diseases REIPI RD06/0008).

REFERENCES

1. Aga RS, Fair E, Abernethy NF *et al.* Microevolution of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* in a strain prevalent in San Francisco. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 1558–1560.
2. Nguyen D, Proulx JF, Westley J, Thibert L, Dery S, Behr MA. Tuberculosis in the Inuit community of Quebec, Canada. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; **168**: 1353–1357.
3. Ijaz K, Yang Z, Templeton G, Stead WW, Bates JH, Cave MD. Persistence of a strain of *Mycobacterium tuberculosis* in a prison system. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; **8**: 994–1000.
4. Iñigo J, García de Viedma D, Arce A *et al.* Analysis of changes in recent tuberculosis transmission patterns after a sharp increase in immigration. *J Clin Microbiol* 2007; **45**: 63–69.
5. Inigo 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.
6. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT *et al.* Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; **31**: 406–409.
 7. Fernandez de la Hoz K, Inigo J, Fernandez-Martin JI *et al.* The influence of HIV infection and imprisonment on dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* in a large Spanish city. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; **5**: 696–702.
 8. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A *et al.* Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; **35**: 907–914.
 9. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Loch C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 3563–3571.
 10. Garcia de Viedma D, Bouza E, Rastogi N, Sola C. Analysis of MTB genotypes in Madrid: description of two new families specific to Spain-related settings. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 1797–1806.
 11. Theus SA, Cave MD, Eisenach KD. Intracellular macrophage growth rates and cytokine profiles of *Mycobacterium tuberculosis* strains with different transmission dynamics. *J Infect Dis* 2005; **191**: 453–460.
 12. Theus SA, Cave DM, Eisenach K *et al.* Differences in the growth of paired Ugandan isolates of *Mycobacterium tuberculosis* within human mononuclear phagocytes correlate with epidemiological evidence of strain virulence. *Infect Immun* 2006; **74**: 6865–6876.
 13. Sharma MK, Al-Azem A, Wolfe J, Hershfield E, Kabani A. Identification of a predominant isolate of *Mycobacterium tuberculosis* using molecular and clinical epidemiology tools and in vitro cytokine responses. *BMC Infect Dis* 2003; **3**: 3.
 14. Petrelli D, Kaushal Sharma M, Wolfe J, Al-Azem A, Hershfield E, Kabani A. Strain-related virulence of the dominant *Mycobacterium tuberculosis* strain in the Canadian province of Manitoba. *Tuberculosis* 2004; **84**: 317–326.

RESEARCH NOTE

Spread of the *Streptococcus pneumoniae* Taiwan^{19F}-14 clone among children in Greece

A. Mavroidi¹, I. Paraskakis², A. Pangalis³, E. Kirikou³, A. Charisiadou³, T. Athanasiou², P. T. Tassios¹ and L. S. Tzouveleki⁴

¹Department of Infectious Disease Epidemiology, Faculty of Medicine, Imperial College, London, UK, ²Department of Microbiology, A. & P. Kyriakou Childrens' Hospital (Annexe), ³Department of Microbiology, Aghia Sofia Childrens' Hospital and ⁴Department of Microbiology, School of Medicine, University of Athens, Athens, Greece

ABSTRACT

Serotype 19F pneumococci were a leading cause of infections among children in Athens, Greece during 2001–2006. In total, 143 19F isolates were typed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and 38 isolates representing the main PFGE types were also characterised by multilocus sequence typing. A diversity of distinct strains belonging to sequence types 236, 1035, 274, 172 and 319 were identified, but multidrug-resistant isolates related to the Taiwan^{19F}-14 clone (ST236) constituted 76.9% of the isolates. Spread of the Taiwan^{19F}-14 clone explains, in part, the high incidence of antibiotic resistance observed among pneumococci reported recently from Athens.

Keywords Children, epidemiology, Greece, pneumococci, *Streptococcus pneumoniae*, Taiwan^{19F}-14

Original Submission: 19 April 2007; **Revised Submission:** 5 July 2007; **Accepted:** 17 July 2007

Clin Microbiol Infect 2007; **13**: 1213–1216
10.1111/j.1469-0691.2007.01837.x

Treatment of pneumococcal infections can be complex because of the dissemination of clones

Corresponding author and reprint requests: L. S. Tzouveleki, Department of Microbiology, School of Medicine, National University of Athens, M. Asias 75, Athens 11521, Greece
E-mail: ltzouvel@cc.uoa.gr

OBJETIVO 7:

Caracterizar mediante estrategias de genómica y transcriptómica dos variantes clonales de *M. tuberculosis* con diferente comportamiento infeccioso.

“Caracterización genómica y transcriptómica de dos variantes clonales de *M. tuberculosis* con comportamientos infectivos diferentes”

RESUMEN

En el contexto del estudio de la complejidad clonal durante la infección por *M. tuberculosis*, se decidió caracterizar en detalle un representante en el que se hubiera documentado una infección de este tipo. El caso seleccionado correspondió a una niña de dos años sin factores de riesgo para tuberculosis en la que se aislaron dos variantes clonales de alta similitud genotípica, que únicamente mostraron diferencias menores en sus RFLP-tipos, compartiendo idénticos perfiles de Spoligotipado y VNTR-MIRU. Estas variantes clonales mostraron una capacidad diferente para infectar tejidos extrarrespiratorios, ya que sólo una de ellas fue aislada del Sistema Nervioso Central (97). Al analizar la infectividad de ambas en un modelo *in vitro* de macrófagos derivados de monocitos humanos, las dos variantes mostraron una eficiencia equivalente para infectar dichas células (97).

Teniendo en cuenta que, a pesar de la elevada similitud que presentan entre sí dichas variantes clonales, existe una gran diferencia en cuanto a su capacidad para infectar tejidos extrarrespiratorios, resultaba de gran interés intentar identificar diferencias a nivel genómico que pudieran explicar en sus diferentes fenotipos. Se realizó una caracterización genómica y transcriptómica con el fin de analizar la presencia de posibles regiones diferenciales en el genoma, así como diferencias en la expresión génica durante el cultivo *in vitro*. Sin embargo, no se observaron diferencias a este nivel, ya que las dos variantes clonales presentaron una similitud total tanto en el análisis genómico, como en la caracterización transcriptómica. Estudios posteriores que analicen los perfiles de expresión génica generados por las dos variantes clonales tras la infección de la célula hospedadora podrían ayudar a explicar sus fenotipos diferenciales.

Metodología

Cepas de *M. tuberculosis*

Se seleccionaron para este estudio dos variantes clonales de *M. tuberculosis* aisladas por este grupo en un estudio previo (97).

Cultivo de cepas, extracción y marcaje de ADN para análisis genómico

Los aislados fueron subcultivados en medio sólido Lowenstein-Jensen (Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA) durante 2-3 semanas a 37° C. Se siguió el mismo proceso de extracción y purificación de ADN descrito en objetivos anteriores.

El ADN marcado fluorescentemente se obtuvo mediante PCR en presencia de Cy3-dCTP o Cy5-dCTP (Amersham Pharmacia) y oligonucleótidos hexámeros al azar para iniciar la síntesis.

Cultivo de cepas, extracción de ARN y obtención de cADN para análisis transcriptómico

Los aislados se subcultivaron en medio líquido 7H9 (Middlebrook 7H9, Difco) suplementado con 10% de OADC (Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA) y 0.05% de Tween 80. Los cultivos se incubaron a 37° C y en agitación hasta alcanzar una DO=0.5, correspondiente a una fase de crecimiento exponencial.

Se centrifugaron 10 ml de cultivo líquido bacteriano durante 15 min. a 3.500 rpm y 4° C, se desechó el sobrenadante y, sobre el precipitado, se añadió 1.2 ml de Trizol[®] (Invitrogen). El volumen se transfirió inmediatamente a un tubo de microcentrífuga de 2 ml con 0.5 ml de perlas de vidrio y se sometió a un proceso de lisado en un FastPrep[®] FP120 durante 45 seg. a una potencia de 6.5 w. A continuación, las muestras se dejaron en reposo durante 10 min. a temperatura ambiente y posteriormente se transfirió todo el volumen a un tubo líquido. A partir de aquí se continuó con el procedimiento habitual de extracción de ARN con Trizol[®] recomendado por el fabricante. El ARN se resuspendió en 100 µl de agua libre de nucleasas y, tras un tratamiento con ADN-asa (Qiagen), se purificó utilizando el kit de purificación RNeasy columns (Qiagen). Se extrajo el ARN de tres réplicas biológicas de cada una de las variantes clonales.

El ADNc marcado fluorescentemente se obtuvo por transcripción reversa a partir de 2-10 µg de ARN, empleando la enzima Superscript III (Invitrogen) en presencia de

Cy3-dCTP o Cy5-dCTP (Amersham Pharmacia) y oligonucleótidos hexameros al azar para iniciar la síntesis.

Microarrays e hibridaciones

Los microarrays de ADN fueron suministrados por el grupo de microarrays bacterianos de la Universidad St. Georges (<http://bugs.sgul.ac.uk/index.php>). La prehibridación, hibridación y lavados se llevaron a cabo según el procedimiento descrito por Stewart et al. (207).

Análisis de los datos obtenidos en los microarrays

Las imágenes obtenidas para los canales Cy3 y Hyper5 se equilibraron y capturaron con GenePix 4000B (Axon Instruments) y los spots se cuantificaron empleando el software de GenePix (Axon Instruments). Finalmente se hizo un análisis estadístico utilizando el software de análisis SAM (Significance Analysis of Microarrays) de la Universidad de Stanford. Se consideraron significativos aquellos genes que presentasen un cambio en su nivel de expresión > 2 ó < -2 .

Resultados

Análisis genómico

Al analizar los resultados obtenidos tras hibridar el ADN genómico de las dos variantes clonales, no se detectaron diferencias a nivel genómico que indicasen la presencia de deleciones en alguna de las dos variantes clonales, ya que en ninguno de los casos se observó ningún gen que presentase un fold change fue > 2 ó < -2 (ver información suplementaria incluida en CD: anexo 8).

Análisis transcriptómico

Al rastrear la presencia de genes que se expresasen diferencialmente en una de las variantes clonales con respecto a la otra, únicamente se identificaron cambios sutiles inferiores al cambio establecido en el nivel de expresión. No se observaron, por tanto, diferencias a nivel transcriptómico entre las dos variantes clonales (ver información suplementaria incluida en CD: anexo9).

OBJETIVO 8:

Analizar la virulencia de una selección de cepas Beijing y caracterizar la expresión génica celular tras la infección.

“Análisis de la virulencia de una selección de cepas Beijing y estudio del perfil transcriptómico celular generado tras la infección”.

RESUMEN

El linaje W-Beijing está constituido por una familia de cepas de *M. tuberculosis* muy conservada genéticamente, ampliamente distribuida por todo el mundo y que ha estado implicada en grandes brotes de tuberculosis en diferentes regiones, lo que sugiere que esta familia posee una mayor virulencia y/o capacidad de diseminación en la población.

Los modelos de infección que utilizan líneas celulares de monocitos diferenciados han demostrado ser útiles para estimar la virulencia de las cepas de *M. tuberculosis*, mediante la medición de las tasas de replicación intracelular y de la producción de citoquinas. En respuesta a la infección, la célula modificará su perfil de expresión génica y la activación o inhibición de determinados genes será determinante para que el macrófago logre activar correctamente la respuesta inmune que conduce a la eliminación del bacilo. Se conoce que los principales genes del macrófago que modifican sus niveles de expresión en respuesta a la infección por *M. tuberculosis* son genes que codifican citoquinas, quimiocinas, moléculas de señalización y proteínas de adhesión y estrés oxidativo

Se midió la infectividad de una selección de 8 aislados pertenecientes a la familia W-Beijing en el modelo de infección de la línea celular THP-1, observándose un amplio rango de tasas de replicación intracelular. Sólo dos de los aislados mostraron una tasa de replicación más elevada y, en ambos casos, se asoció con una producción contenida de TNF- α . No se observó una correlación entre la virulencia y el estatus “huérfana” o “en cluster” de las cepas.

A continuación, se analizó el perfil transcriptómico celular generado tras la infección con una selección de 3 aislados Beijing incluidos en el ensayo anterior (incluyéndose los 2 aislados que mostraron infectividad elevada) y la cepa de referencia H37Rv, observándose un perfil de represión mayoritario, común a la infección por todas las cepas de *M. tuberculosis* evaluadas. En este perfil común de represión se encontraron,

entre otros, genes implicados en: defensa, respuesta a daño celular, respuesta inflamatoria y respuesta inmune.

Asimismo, se observó que el perfil transcriptómico generado tras la infección por las cepas pertenecientes a la familia W-Beijing presentaba un número reducido de genes con patrón de expresión común, tanto al comparar los perfiles generados en las infecciones correspondientes a las 3 cepas Beijing, como al analizar únicamente la expresión generada por las 2 cepas de mayor infectividad. Se identificó, por tanto, una predominancia de perfiles de expresión específicos de cada cepa.

Podemos concluir tras este estudio que, en nuestro contexto, sólo determinados representantes de la familia Beijing presentan una virulencia más elevada y que dicha virulencia no está asociada a un mecanismo común de regulación del perfil transcriptómico de la célula hospedadora.

ANÁLISIS DE LA INFECTIVIDAD DE CEPAS PERTENECIENTES A LA FAMILIA BEIJING

Metodología

Cepas de *M. tuberculosis*

Durante el período 2002-2007 se identificaron en nuestra institución un total de 26 aislados con genotipo perteneciente a la familia W-Beijing (1.09% del total de cepas analizadas en ese período). 8/26 aislados fueron seleccionados para el análisis de infectividad *in vitro*, atendiendo a la nacionalidad del caso del que se aislaron, el perfil de sensibilidad, el número de copias de IS6110 y a su clasificación como huérfana o en cluster (Tabla 1). Uno de los representantes seleccionados correspondió a la cepa responsable del brote que tuvo lugar en la isla de Gran Canaria en el período 1993-1996 (44). Como controles se incluyeron en el análisis la cepa de referencia H37Rv y un representante de una cepa de genotipo huérfano no perteneciente a la familia Beijing (cepa C).

Tabla 1. Cepas Beijing analizadas en el modelo de infección *in vitro*

Código aislado	No. Cepa	Nacionalidad	Perfil de sensibilidad	No. Copias IS6110	Cluster/Huérfana (+/-) ^a
8687	1	España	S	16	+
6955	2	Moldavia	S	16	-
673	3	Ecuador	S	13	+
5261	4	Perú	INH-R	22	-
8281	5	Armenia	S	21	-
5204	6	China	S	22	-
6898	7	Ecuador	S	9	-
7992	8	Ecuador	S	20	-

^a + y - indican la clasificación en cluster o huérfana

Caracterización de infectividad *in vitro*

Se siguió la metodología descrita en el Objetivo 6 utilizando la línea celular THP-1 diferenciada a macrófagos.

Análisis estadístico

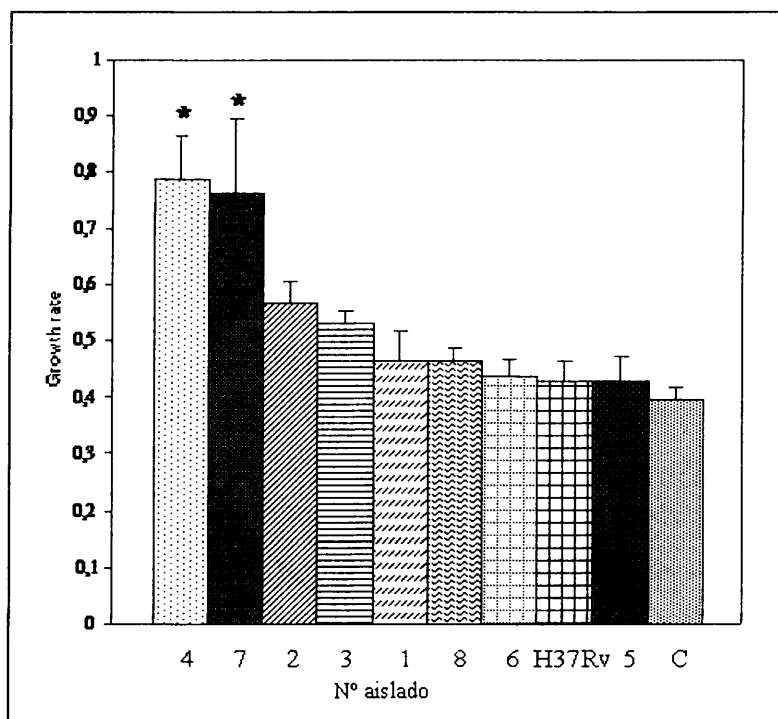
Se realizaron tres réplicas independientes para cada cepa. Las medias y los errores estándares se determinaron para cada medida de crecimiento intracelular y de producción de citoquinas. Un ANOVA de una vía con medidas repetidas fue el análisis empleado para calcular el p-valor, el cual se ajustó por el método de Bonferroni. Todas las comparaciones se realizaron utilizando el programa SPSS 17.0

Resultados

Evaluación del crecimiento intracelular

Se observó un rango amplio de tasas de crecimiento intracelular entre los distintos aislados analizados (Figura 1). Dos de los aislados (cepas 4 y 7) mostraron las tasas de crecimiento más elevadas, las cuales difirieron significativamente ($P < 0.05$) de las observadas en el resto. El aislado responsable del brote observado en Gran Canaria (cepa 1) no presentó una tasa de replicación más elevada. No hubo diferencias entre el resto de aislados analizados, incluyendo los dos utilizados como control.

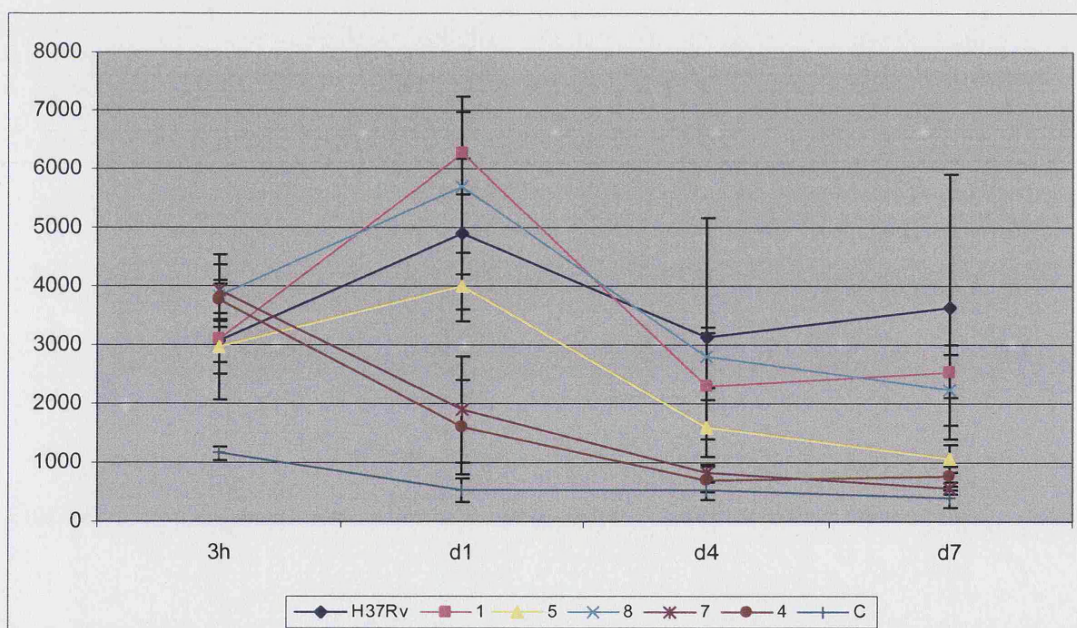
Figura 1. Tasas de crecimiento intracelular



Producción de citoquinas

Se estudió el perfil de producción de citoquinas inmunorreguladoras producidas tras la infección de la línea celular THP-1 con 6 de los aislados (1, 4, 5, 7, 8 y H37Rv) seleccionados como representativos de las diferentes tasas de crecimiento observadas en el apartado anterior. Cuatro de los aislados indujeron los niveles máximos de TNF- α en el día 1 de infección, teniendo lugar a continuación un rápido descenso en la producción de esta citoquina (Figura 2A). Sin embargo, en los dos aislados que mostraron las tasas de replicación más elevadas en el ensayo anterior, el perfil de producción de TNF- α fue diferente, ya que la secreción de esta citoquina estuvo contenida desde el inicio de la infección y a día 1 sus niveles de inducción fueron más bajos que los del resto de los aislados. Los niveles de TNF- α en estos dos aislados continuaron disminuyendo a lo largo de toda la infección (Figura 2A).

Figura 2. Producción de TNF- α por las células THP-1 infectadas



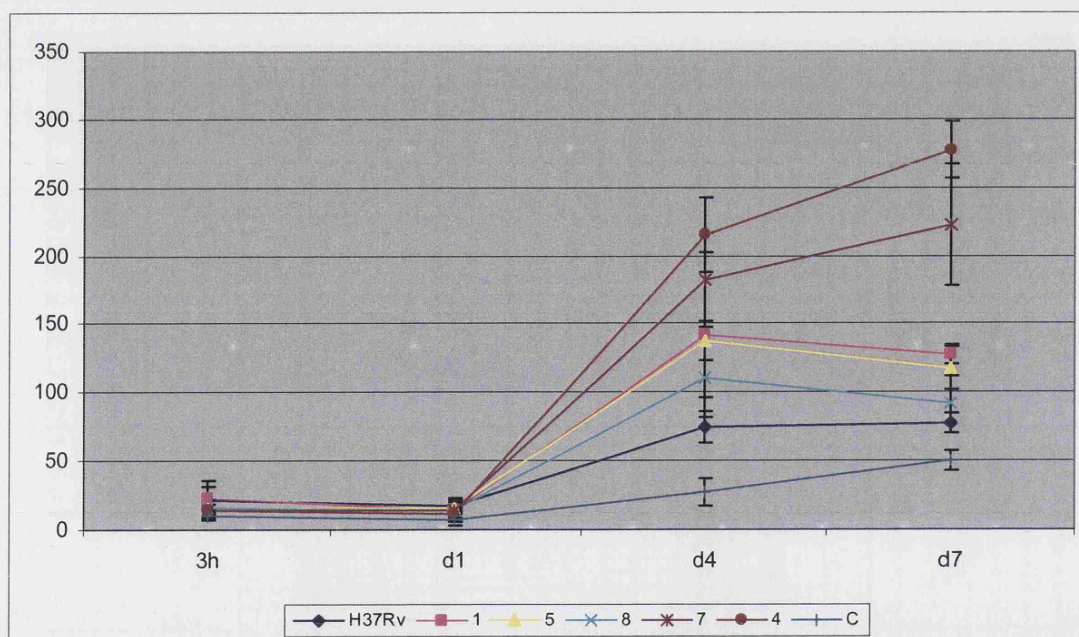
Los perfiles de secreción de IL-10 en las células THP-1 fueron similares para todos los aislados durante los primeros estadios de la infección. Antes del día 1 de infección no se detectó la presencia de IL-10 y los niveles máximos de producción de esta citoquina se observaron a día 4. A partir de aquí, los niveles de IL-10 comenzaron a disminuir en todos los aislados excepto en dos, en los cuales los niveles continuaron siendo elevados hasta el final de la infección (Figura 2B). Estos dos aislados correspondieron con los dos

aislados que contuvieron la producción de TNF- α y que mostraron las tasas de replicación intracelular más elevadas tras la infección de las células THP-1. Se observó, por tanto, una correlación entre la tasa de replicación intracelular, la producción de TNF- α y la respuesta inmunorreguladora a través de IL-10 en las células THP-1 infectadas.

Los dos aislados con un comportamiento infeccioso diferente en el modelo de infección THP-1 correspondieron a dos aislados huérfanos de origen Sudamericano. El aislado responsable del brote de Gran Canaria no exhibió un comportamiento infeccioso diferencial con respecto al resto de los aislados.

Atendiendo a la clasificación como “huérfana” o “en cluster” de los aislados, el análisis de crecimiento intracelular y los perfiles de expresión de citoquinas no mostraron una correlación entre la eficiencia de transmisión de la cepa y el comportamiento infeccioso en el modelo de infección THP-1.

Figura 3. Producción de IL-10 por las células THP-1 infectadas



CARACTERIZACION DEL PERFIL TRANSCRIPTOMICO CELULAR GENERADO TRAS LA INFECCION CON CEPAS DE LA FAMILIA W-BEIJING

Metodología

Cepas de *M. tuberculosis*

Se seleccionaron las dos cepas de *M. tuberculosis* pertenecientes a la familia W-Beijing que mostraron, en el apartado anterior, un comportamiento infectivo incrementado (cepas 7 y 4), junto con otra de las cepas Beijing que no destacó en su infectividad (cepa 5) y la cepa de referencia no Beijing H37Rv.

Las distintas cepas se cultivaron en medio 7H9 (Middlebrook 7H9, Difco), suplementado con 10% de OADC (Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA) y 0.05% de Tween 80 a 37°C y en agitación, hasta alcanzar una DO de 0.2 - 0.3 a una λ de 540nm.

Cultivos celulares

Para el mantenimiento de los cultivos celulares se siguió el procedimiento descrito en el Objetivo 6.

Infección de las células THP-1

Se diferenciaron 15×10^6 células en flasks de 25cm², mediante incubación con PMA 100 nM durante 72 horas. A cada flask se añadieron 5 ml de medio de cultivo celular (Ver Objetivo 6) con la suspensión bacteriana adecuada para conseguir una multiplicidad de infección de 10-15 bacterias por célula. La infección se mantuvo durante 4 horas a 37°C y 5% de CO₂. Tras la infección se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con 7 ml de tampón-fosfato salino (PBS) y se añadieron 7 ml de medio de cultivo. A las 18 h los flasks se procesaron para la extracción del ARN celular.

Para cada cepa se realizaron dos experimentos en días independientes, incluyendo en cada uno de ellos tres réplicas del ensayo, con sus correspondientes controles de células sin infectar.

Extracción de ARN celular

El ARN se extrajo añadiendo a cada flask 2.5 ml de reactivo Trizol[®] (Invitrogen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN se resuspendió en 100 μ l de agua libre

de nucleasas y, tras un tratamiento con ADN-asa (Qiagen), se purificó utilizando el kit de purificación en columnas RNeasy (Qiagen). Una vez purificado, el ARN se conservó a -80° C hasta su posterior utilización.

Amplificación del ARN e hibridación con los microarrays

Se utilizó 1 µg de ARN para amplificar y marcar con radical aminoalil (5-(3-aminoalil)-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato (aa-dUTP, Ambion)), empleando el kit de amplificación de ARN MessageAmpTM II aRNA kit (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante. Por cada muestra, se resuspendieron 7.5 µg de ARN amplificado en 0.1 M Na₂CO₃ (pH 9.0) y se marcaron con Cy3 o Hyper5 (CyTMDye Post-labelling Reactive Dye Pack, Amersham). A continuación, el ARN marcado se purificó con el kit MegaclearTM (Ambion), según las indicaciones del fabricante. A partir de 1 µl de cada muestra se valoró la incorporación de Cy3 o Hyper5 en el espectrofotómetro Nanodrop[®] (Nanodrop Technologies Inc.). Para el análisis de expresión se utilizaron los microordenamientos de oligos de 60 mer de Agilent (ref. 014850) de alta densidad (4 x 44K) que representan todos los genes y transcritos del genoma humano. Para la hibridación y lavado de estos microordenamientos, se siguió el manual para el análisis de expresión con dos colores publicado por Agilent Technologies.

Análisis de los datos obtenidos en los microarrays

Las imágenes obtenidas para los canales Cy3 y Hyper5 se equilibraron y capturaron con GenePix 4000B (Axon) y las señales de hibridación se cuantificaron empleando el software de GenePix (Axon).

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el algoritmo no-paramétrico "Rank products" propuesto por Breitling et. al (35) y disponible como "RankProd package" en Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>) (112).

Este método selecciona genes que han sido clasificados sistemáticamente como diferencialmente expresados en un cierto número de réplicas, independientemente de sus intensidades numéricas. Los resultados son representados en forma de p-valor, definiéndose éste como la probabilidad de que un gen determinado sea seleccionado por azar en una determinada posición. Se consideraron como diferencialmente expresados aquellos genes en los que el p-valor corregido (FDR) fue < 0.05 (the False Discovery rate menor del 5%). Los genes que presentaron un FDR < 0.05 y un cambio en su perfil de

expresión respecto a las células control > 2.5 ó < -2.5 fueron seleccionados para análisis posteriores.

Para el análisis de categorías funcionales disponibles en Gene Ontology (GO, www.geneontology.org) se utilizó el software DAVID (69). Se consideraron únicamente aquellas categorías funcionales que incluían, al menos, 6 genes expresados diferencialmente y en las que el p-valor de enriquecimiento funcional fue < 0.01

Resultados

Considerando como referencia los perfiles de expresión obtenidos con los controles de células sin infectar, se detectó una expresión diferencial en 905 genes, que presentaron un cambio en su expresión > 2.5 ó < -2.5 en los ensayos de infección con las diferentes cepas analizadas.

Inicialmente, de estos 905 genes, se eliminaron del análisis aquellos que se comportaron homogéneamente (inducidos o reprimidos en todos los casos con un cambio de expresión > 1.5 ó < -1.5) para las 4 cepas analizadas (Beijing y no Beijing), con el fin de poder abordar el análisis de perfiles de expresión específicos. Esto condujo a la eliminación de 406 genes entre los que predominaba un perfil común de represión (Anexo 1), que incluye a implicados genes que codifican citoquinas, quimiocinas, integrinas, proteínas implicadas en rutas de señalización, tráfico intracelular y estrés oxidativo. El análisis mediante Gene Ontology agrupó estos genes en diversas categorías funcionales (Figura 1), siendo las categorías funcionales de defensa, respuesta a daño, respuesta inflamatoria y respuesta inmune, las cuatro categorías asignadas con mayor significación.

Una vez eliminados del análisis los genes con expresión homogénea en las distintas infecciones, se decidió rastrear un posible perfil de expresión específico para las cepas Beijing. Para ello, de los 498 genes restantes en estudio se identificaron aquellos genes expresados homogéneamente en las infecciones con cepas Beijing pero que difirieran del perfil obtenido con la cepa no Beijing (cambio en su expresión > 1.5 ó < -1.5). Únicamente, el perfil de expresión de 29 genes era compartido y específico para las tres cepas Beijing analizadas (Anexo 2), entre los que se encuentran los genes que codifican las proteínas de choque térmico de 90, 70 y 27 KDa, la IL-24 y la caspasa 10. Entre los genes cuyos perfiles de expresión eran compartidos por las tres cepas Beijing se

encontraron genes incluidos en las categorías funcionales de: respuesta a estímulos bióticos, respuesta frente a proteínas desplegadas y respuesta a estímulos proteicos.

A continuación se exploró si era posible identificar un perfil de expresión específico para las dos cepas Beijing de mayor infectividad (cepas 4 y 7). De modo equivalente al análisis anterior, se seleccionaron los genes cuyo patrón de expresión fuera compartido por estas cepas pero no por la cepa Beijing de baja infectividad. De nuevo, únicamente un número reducido de genes, 42, mostraron un perfil de expresión compartido y específico de las cepas Beijing de mayor infectividad (Anexo 3), entre los que se encuentran los genes que codifican la proteína β de choque térmico de 90 kDa, la fibronectina tipo 3 y la quimiocina CXCL9. Las categorías funcionales en las que se encontraron algunos de estos genes fueron las mismas que las descritas en el caso anterior y se añadía, además, la categoría funcional de respuesta a estrés.

Entre los perfiles de expresión diferenciales que se observaban al infectar con cada una de las cepas Beijing (Anexos 4, 5 y 6), se seleccionaron aquellos genes que presentaron cambios en su expresión > 3 ó < -3 (tabla 1).

En el perfil de expresión diferencial generado tras la infección por la cepa 4 se incluyeron un total de 39 genes (Anexo 4). Entre los ejemplos de genes que se encuentran inducidos diferencialmente y que son de interés en el contexto de la infección por *M. tuberculosis*, se observó una inducción importante en aquellos genes que codifican el fragmento Fc de la inmunoglobulina G, así como en el gen que codifica la defensina $\beta 1$ y el receptor acoplado a proteína G “GPR18”. Asimismo, la infección por esta cepa no provocó apenas cambios en la expresión del gen que codifica el ligando “TNFSF10”, mientras que, tras la infección con las otras 3 cepas, se observó que este gen se encontraba muy reprimido (tabla 1). Algunos de los genes que cambian su expresión tras la infección por esta cepa se encontraron incluidos en la categoría funcional de procesos inmunológicos (tabla 2).

En el caso de la infección con la cepa 7 se observó un total de 30 genes con cambios en su expresión > 3 ó < -3 (Anexo 5). En el contexto de la infección por *M. tuberculosis*, cabe destacar aquellos genes que codifican: IL-1 β , receptor de IL-3, MMP1 y MMP12, los cuales se encuentran inducidos tras la infección por esta cepa. Asimismo, conviene resaltar que el gen que codifica IL-6 o IFN- $\beta 2$, tras la infección por esta cepa, no cambia sus niveles de expresión en comparación con el control de células sin infectar, mientras que, en las células infectadas con las otras tres cepas, este gen se encuentra muy

reprimido (tabla 1). Los genes que presentaron mayores cambios en su expresión tras la infección con la cepa 7 son genes incluidos en las categorías funcionales de: procesos metabólicos, procesos celulares y procesos inmunológicos, así como genes implicados en defensa y respuesta a estímulos externos (tabla 2).

Por último, en el perfil de expresión génica generado por la infección con la cepa Beijing de menor infectividad (Cepa 5) se observaron únicamente cinco genes expresados diferencialmente (Anexo 6). Entre ellos, cabe resaltar el comportamiento de los genes que codifican el receptor scavenger de macrófagos “MSR1” (no cambia su expresión tras la infección con la cepa 5 y se encuentra inducido en los otros 3 casos), y el receptor de IL-3 (no cambian su expresión tras la infección con la cepa 5, inducido en la infección con cepa 7 y reprimido en la infección con cepas 4 y H37Rv) (tabla 1). No se obtuvo ninguna categoría funcional que se ajustase a los criterios prefijados en el caso la cepa 5.

Figura 1. Categorías funcionales en las que Gene Ontology agrupó los genes implicados en el perfil de expresión común frente a *M. tuberculosis*

Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
OTERM_BP_ALL	defense response	RT		57	16,4	2,2E-25	1,2E-21
OTERM_BP_ALL	response to wounding	RT		47	13,5	1,4E-22	3,7E-19
OTERM_BP_ALL	inflammatory response	RT		40	11,5	2,9E-22	5,0E-19
OTERM_BP_ALL	immune response	RT		67	19,3	4,5E-22	6,0E-19
OTERM_BP_ALL	immune system process	RT		72	20,7	3,2E-20	3,3E-17
OTERM_BP_ALL	response to external stimulus	RT		51	14,7	1,8E-18	1,5E-15
OTERM_BP_ALL	response to stimulus	RT		119	34,2	1,0E-17	7,9E-15
OTERM_BP_ALL	response to virus	RT		21	6,0	1,1E-15	7,3E-13
OTERM_BP_ALL	locomotory behavior	RT		27	7,8	2,9E-15	1,7E-12
OTERM_BP_ALL	taxis	RT		24	6,9	3,5E-15	1,8E-12
OTERM_BP_ALL	chemotaxis	RT		24	6,9	3,5E-15	1,8E-12
OTERM_BP_ALL	response to stress	RT		59	17,0	6,5E-14	2,8E-11
OTERM_BP_ALL	response to other organism	RT		25	7,2	3,0E-13	1,2E-10
OTERM_BP_ALL	behavior	RT		30	8,6	2,2E-12	8,1E-10
OTERM_BP_ALL	multi-organism process	RT		27	7,8	2,1E-10	7,2E-8
OTERM_BP_ALL	response to biotic stimulus	RT		26	7,5	6,7E-10	2,2E-7
OTERM_BP_ALL	response to chemical stimulus	RT		35	10,1	6,0E-9	1,9E-6
OTERM_BP_ALL	death	RT		38	10,9	5,3E-7	1,5E-4
OTERM_BP_ALL	cell death	RT		38	10,9	5,3E-7	1,5E-4
OTERM_BP_ALL	system development	RT		62	17,8	5,4E-7	1,4E-4
OTERM_BP_ALL	developmental process	RT		96	27,6	5,9E-7	1,5E-4
OTERM_BP_ALL	programmed cell death	RT		36	10,3	1,2E-6	2,8E-4
OTERM_BP_ALL	organ development	RT		49	14,1	1,4E-6	3,1E-4
OTERM_BP_ALL	cell differentiation	RT		62	17,8	2,2E-6	4,6E-4
OTERM_BP_ALL	cellular developmental process	RT		62	17,8	2,2E-6	4,6E-4

Tabla 1. Perfiles de expresión génica celular específicos de cada cepa

Cepa	Descripción gen	Código gen	Niveles de expresión génica en THP-1 con respecto a controles sin infectar			
			1,38	4,61	1,24	1,19
7	5'-nucleotidase	NM_002526	1,35	7,01	1,2	1,23
	Jagged 1 (Alagille syndrome) (JAG1)	NM_000214	1,34	5,1	-1,7	1,21
	Transmembrane 4 L six family member 19 (TM4SF19)	NM_138461	1,21	3,37	-1,1	-1
	Ankyrin repeat domain 15 (ANKRD15)	NM_153186	-1,1	3,78	1,01	1,46
	Cbp/p300-interacting transactivator	NM_133467	-1,2	3,88	-1,5	-1,5
	CD55 molecule	NM_000574	-1,3	3,4	-1,2	-1,4
	Solute carrier family 31 (copper transporters)	NM_001860	-1,4	3	-3,2	1,4
	Pim-1 oncogene (PIM1)	NM_002648	-1,5	6,36	-2,3	-1,7
	Amphiregulin (schwannoma-derived growth factor) (AREG)	NM_001657	-1,6	3,34	-2,9	-1,5
	Solute carrier organic anion transporter family	NM_016354	-1,7	13,1	-1,9	-1,5
	Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase) (MMP1)	NM_002421	-1,8	6,2	-2,6	-2,6
	Uridine phosphorylase 1 (UPP1)	NM_181597	-1,9	3,49	-3	-1,3
	Sprouty homolog 4 (Drosophila) (SPRY4)	NM_030964	-2,2	10,7	-1,1	-1,3
	Early growth response 1 (EGR1)	NM_001964	-3	1,74	-4,2	-2,4
	Interleukin 1 receptor antagonist (IL1RN)	NM_173842	-3	4,17	-5,9	-2,1
	Dual specificity phosphatase 5 (DUSP5)	NM_004419	-3,1	1,43	-5,8	-3,6
	Regulator of G-protein signalling 16 (RGS16)	NM_002928	-3,6	1,01	-4,8	-3,7
	Deleted in azoospermia-like (DAZL)	NM_001351	-3,6	2,3	-3,3	-1,3
	Interleukin 3 receptor	NM_002183	-3,9	1,17	-11	-6,2
	Leprecan-like 1 (LEPREL1)	NM_018192	-4,9	-1,2	-7,5	-3,6
Solute carrier family 7	NM_014331	-6,1	19,2	-5,2	-3,3	
Matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase) (MMP12)	NM_002426	-6,8	-1,1	-7,4	-4,4	
Chemokine (C-C motif) ligand 1 (CCL1)	NM_002981	-7,3	-1,2	-7,2	-3	
Integrin	NM_181501					

	Interleukin 1	NM_000576	-8,5	2,94	-60	-16
	Immediate early response 3 (IER3)	NM_003897	-10	1,17	-23	-6,5
	Inhibin	NM_002192	-16	1,37	-9,6	-2
	Interferon	NM_005532	-17	-1,4	-1,6	-4,5
	Interferon stimulated exonuclease gene 20kDa (ISG20)	NM_002201	-22	-1,1	-3,8	-8,2
	Interleukin 6 (interferon)	NM_000600	-27	-1,5	-3,4	-2,2
4	Tumor protein D52-like 1 (TPD52L1)	NM_001003395	1,28	1,4	6,12	1,31
	protein tyrosine phosphatase-like	NM_198402	1,06	1,28	4,03	1,31
	Ubiquitin-conjugating enzyme E2M pseudogene 1	NR_002837	1,03	-1,4	-3,3	1,32
	G protein-coupled receptor 18 (GPR18)	NM_005292	1,01	1,31	6,22	-1,2
	Nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate	NM_022731	1	1,02	4,39	1,1
	Insulin-like growth factor binding protein 7 (IGFBP7)	NM_001553	-1	1,06	3,75	-1,1
	NM_004536 Homo sapiens baculoviral IAP repeat-containing 1 (BIRC1)	NM_004536	-1	1,5	4,39	1,11
	Fc fragment of IgG	NM_000569	-1,2	-1,1	4,87	1,08
	Formin-like 1 (FMNL1)	NM_005892	-1,2	1,18	-4,3	1,12
	V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian) (MYB)	NM_005375	-1,2	1,21	3,84	1,2
	AKT1 substrate 1 (proline-rich) (AKT1S1)	NM_032375	-1,3	-1,2	-3,8	1,26
	Bone morphogenetic protein 1 (BMP1)	NM_006128	-1,3	-1,1	-3,5	1,2
	Phosphogluconate dehydrogenase (PGD)	NM_002631	-1,3	-1,3	-3,5	-1,2
	Midnolin (MIDN)	NM_177401	-1,4	1,14	-3,8	1,04
	Epithelial membrane protein 3 (EMP3)	NM_001425	-1,4	-1	-3,6	1,07
	Pim-1 oncogene (PIM1)	NM_002648	-1,4	3	-3,2	1,4
	Chromosome X open reading frame 6 (CXorf6)	NM_005491	-1,4	1,3	-3,5	-1,3
	Poliovirus receptor (PVR)	NM_006505	-1,4	-1,4	-3,7	-1,3
	Transmembrane	NM_020182	-1,5	1,03	-3,6	-1,3
	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1 (RAPGEF1)	NM_198679	-1,5	-1,1	-4,4	-1,1
	Tyrosine phosphatase-like A domain containing 2 (PTPLAD2)	NM_001010915	-1,5	1,27	3,61	-1,2
	Sub-family member 12 (COLEC12)	NM_030781	-1,5	1,25	9,07	1,15
	Histone 1	NM_003546	-1,5	-1,5	3,97	-1,3
	Tripartite motif-containing 14 (TRIM14)	NM_014788	-1,5	1,14	3,65	-1,1

KIAA1212 (KIAA1212)	NM_018084	-1,6	-1	3,34	-1,2
Fc fragment of IgG	NM_004001	-2,2	1,21	3,6	-1,1
Membrane-spanning 4-domains	NM_022349	-2,3	1,23	9,35	-1
Defensin	NM_005218	-2,4	-1,1	4,15	1,32
Fc fragment of IgG	NM_021642	-2,5	1,27	4,32	1,21
FYN binding protein (FYB-120/130) (FYB)	NM_001465	-2,6	-1,6	3,78	-1,1
Chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican) (CSPG2)	NM_004385	-2,6	1,17	4,29	1,3
Fibrinogen-like 2 (FGL2)	NM_006682	-3,5	-1,1	3,17	1,27
Platelet-derived growth factor receptor-like (PDGFRL)	NM_006207	-5,3	-1,4	3,26	-1,4
Myeloid cell nuclear differentiation antigen (MNDA)	NM_002432	-5,9	1,02	4,75	1,13
Membrane-spanning 4-domains	NM_021201	-9,5	-3,9	-1,5	-3,3
Guanylate binding protein 1	NM_002053	-12	-3,2	-1,4	-3,4
Apolipoprotein B mRNA editing enzyme	NM_145699	-13	-3,3	1,1	-4,4
Homeobox	NM_003865	-17	-3	1,18	-4
Tumor necrosis factor (ligand) superfamily	NM_003810	-39	-5,7	-1,5	-9,5
Coiled-coil domain containing 109B (CCDC109B)	NM_017918	3,06	3,05	5,33	1,18
Macrophage scavenger receptor 1 (MSR1)	NM_002445	2,62	9,92	3,87	1,45
Insulin-like growth factor binding protein 4 (IGFBP4)	NM_001552	-2,8	1,13	-4,5	2,06
Interleukin 3 receptor	NM_002183	-3,6	2,3	-3,3	-1,3
GRAM domain containing 1A (GRAMD1A)	NM_020895	-4,4	-2,3	-6,7	1,05

Tabla 2. Listado de genes y categorías funcionales en las que Gene Ontology agrupó los genes implicados en el perfil de expresión específico de las cepas 4 y 7

Cepa	Anotación funcional	Código gen	Descripción gen	p-valor
4	Respuesta inmune	NM_004001	Receptor CD32 del fragmento Fc de IgG	4,20E-04
		NM_000569	Receptor CD16A del fragmento Fc de IgG	
		NM_002053	Proteína 1 de unión a guanilato inducible por IFN	
		NM_002432	Antígeno de diferenciación nuclear de células mieloides	
		NM_003810	Superfamilia de Ligandos de TNF	
		NM_005218	Defensina β 1	
		NM_001465	Proteína de unión FYB-120/130	
		NM_030781	Subfamilia colectinas	
		NM_004001	Receptor CD32 del fragmento Fc de IgG	
		NM_000569	Receptor CD16A del fragmento Fc de IgG	
		NM_002053	Proteína 1 de unión a guanilato inducible por IFN	
		NM_002432	Antígeno de diferenciación nuclear de células mieloides	
		NM_003810	Superfamilia de Ligandos de TNF	
7	Proceso inmunológico	NM_005218	Defensina β 1	1,70E-03
		NM_001465	Proteína de unión FYB-120/130	
		NM_030781	Subfamilia colectinas	
		NM_000600	IL-6 (Interferón β 2)	
		NM_133467	Transactivador CBP/P300	
		NM_000576	IL-1 β	
		NM_000574	Antígeno CD55	
		NM_002192	Inhibina β A	
		NM_001351	Similar al gen deletado en Azoospermia	
		NM_001964	Gen de respuesta temprana 1	
7	Regulación positiva de procesos metabólicos	NM_000600	IL-6 (Interferón β 2)	1,30E-04
		NM_000600	IL-6 (Interferón β 2)	
		NM_000576	IL-1 β	
7	Proceso inmunológico	NM_000600	IL-6 (Interferón β 2)	1,50E-04
		NM_000576	IL-1 β	

		NM_173842	Receptor antagonista de interleucina 1	
		NM_002981	Ligando 1 de quimiocina (CCL1)	
		NM_000600	IL-6 (Interferón $\beta 2$)	
		NM_000576	IL-1 β	
		NM_002648	Oncogen PIM-1	
		NM_002192	Inhibina βA	
	Regulación negativa de procesos biológicos	NM_153186	Anquilina (dominio 15)	9,20E-04
		NM_001964	Gen de respuesta temprana 1	
		NM_000214	JAG 1	
		NM_002928	Regulador de la señalización por proteína G	
		NM_003897	Gen de respuesta inmediata 3	
		NM_000600	IL-6 (Interferón $\beta 2$)	
		NM_133467	Transactivador CBP/P300	
		NM_000576	IL-1 β	
		NM_000574	Antígeno CD55	3,00E-03
		NM_002192	Inhibina βA	
	Regulación positiva de procesos biológicos	NM_001351	Similar al gen deletcionado en Azoospermia	
		NM_001964	Gen de respuesta temprana 1	
		NM_000214	JAG 1	
		NM_000600	IL-6 (Interferón $\beta 2$)	
		NM_000576	IL-1 β	
		NM_000574	Antígeno CD55	3,50E-03
	Defensa	NM_002192	Inhibina βA	
		NM_173842	Receptor antagonista de interleucina 1	
		NM_002981	Ligando 1 de quimiocina (CCL1)	

DISCUSIÓN

La tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas con mayores tasas de mortalidad en todo el mundo. Asimismo, un tercio de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis* de forma latente, resultando, por tanto, cada vez más necesario reforzar las medidas de control para evitar la transmisión de la tuberculosis en la comunidad. La identificación de todos los casos de tuberculosis y el tratamiento de los mismos son las medidas de control fundamentales. En este sentido, el conocimiento de las características biológicas y patogénicas de *M. tuberculosis* es fundamental para entender sus mecanismos de infección y transmisión, así como para desarrollar nuevos fármacos que eliminen el microorganismo de manera más eficaz.

Durante la década de los 90 una amplia variedad de marcadores genéticos fueron identificados para *M. tuberculosis* (127), aunque finalmente un número reducido de éstos han demostrado tener la capacidad de discriminación y la reproducibilidad suficientes para ser introducidos como técnicas de genotipado a gran escala (126). Estas técnicas de genotipado han permitido ampliar enormemente el conocimiento que se tenía de la infección por *M. tuberculosis*.

Inicialmente, el genotipado de *M. tuberculosis* se aplicó a la identificación de brotes (62, 123, 153, 154) y más tarde se introdujo en estudios poblacionales para el análisis de la transmisión reciente, así como para la identificación de los factores de riesgo asociados a dicha transmisión (49, 201, 229), contribuyendo a reforzar las medidas de control de la tuberculosis en los países industrializados y a reducir, en gran medida, el número de casos.

Debido a los grandes movimientos migratorios que han tenido lugar en los últimos años desde las zonas más desfavorecidas económicamente hacia los países industrializados, estos últimos han visto cómo se producía una desaceleración en la tendencia decreciente en el número de casos de tuberculosis y cómo un gran porcentaje de los mismos se observaba en la población inmigrante. Las técnicas de genotipado han desvelado aspectos interesantes sobre las dinámicas de transmisión de este microorganismo y, en algunos contextos con fuerte presencia de población inmigrante, de manera contraria a lo que se esperaba, se ha observado una gran permeabilidad en la transmisión entre la población autóctona y la población inmigrante. Este hecho sugiere que los casos de tuberculosis detectados en la población inmigrante no siempre son debidos a una reactivación endógena de una cepa adquirida en su país de origen (importación) (12). Asimismo, estas técnicas han desvelado que los entornos de

transmisión pueden ser más diversos de lo que se pensaba, dando un papel, en ocasiones, a los contactos casuales y a en contextos de transmisión diferentes a los que tradicionalmente se había asumido (12, 28, 158).

Gracias al genotipado de *M. tuberculosis*, se han identificado determinados linajes genéticos con una amplia distribución mundial (102), así como cepas responsables de grandes clústeres detectados durante largos períodos de tiempo en determinadas regiones (72, 131), o incluso determinadas cepas que, a lo largo de la historia, han estado asociadas a determinadas poblaciones (192). El interés por conocer cuáles son las características que hacen que estas cepas tengan una mayor distribución ha llevado a desarrollar numerosos estudios, con el fin de elucidar si determinadas cepas poseen una mayor virulencia o una mayor capacidad de control de la respuesta inmune del hospedador. El último avance en estas investigaciones ha surgido tras la anotación del genoma completo de *M. tuberculosis* y el desarrollo de la tecnología de microarrays, que ha permitido identificar determinados polimorfismos genéticos asociados a determinados fenotipos de interés (160, 218), así como avanzar en la caracterización de los genes implicados en la supervivencia de *M. tuberculosis* dentro del macrófago (178, 188).

Además, la implementación de las técnicas de genotipado en los laboratorios de micobacteriología ha ayudado a la mejora del diagnóstico microbiológico, ya que hasta ese momento no se contaba con estrategias eficaces para la identificación de falsos diagnósticos positivos como resultado de contaminaciones cruzadas de laboratorio, fenómeno que ha resultado ser más frecuente de lo esperado (64, 142, 201). Asimismo, la aplicación del genotipado en determinadas situaciones clínicas ha permitido rebatir la antigua creencia de que un segundo episodio de tuberculosis está siempre causado por la misma cepa que provocó el primero, ya que se ha puesto de manifiesto que la reinfección exógena juega un papel importante en la infección por este patógeno, incluso en zonas donde la incidencia de tuberculosis es baja (19, 98). Junto a estos casos de reinfección exógena, otras situaciones mucho más complejas, como infecciones mixtas con dos cepas diferentes de *M. tuberculosis* o con dos variantes clonales de una misma cepa, también han sido identificadas, aunque en un porcentaje mucho menor (32, 59, 97, 99, 122). Esta complejidad clonal en la infección por *M. tuberculosis* ha llevado, en algunas ocasiones, a observar distintos comportamientos infectivos entre las diferentes cepas o variantes clonales aisladas de un mismo paciente (97, 99).

1. Epidemiología Molecular: Identificación de entornos de análisis con limitaciones y desarrollo de nuevas aproximaciones metodológicas y analíticas orientadas a solventarlas

En 1993, IS6110-RFLP fue propuesta como la técnica de genotipado de referencia para *M. tuberculosis* (225) y, desde entonces, ha sido la técnica empleada en la mayoría de los estudios de epidemiología molecular (49, 131, 201, 229). Sin embargo, a pesar de la elevada capacidad de discriminación que ha demostrado en comparación con otras herramientas de genotipado (126, 127), aún existen diversas limitaciones en el estudio de la transmisión de la tuberculosis que han de ser solventadas.

Una de las principales desventajas de la técnica IS6110-RFLP es que requiere que los cultivos de *M. tuberculosis* sean incubados durante largos períodos de tiempo, para obtener una cantidad de ADN suficiente para que pueda realizarse. Esto hace que la obtención de los resultados del genotipado por IS6110-RFLP se prolongue tiempo después de realizar el diagnóstico de tuberculosis a un paciente y se disponga de ellos en un momento en que su utilidad es reducida, puesto que el estudio de contactos ya ha finalizado. Especialmente en contextos con población inmigrante, es esencial disponer rápidamente de los resultados, dada la gran movilidad de este tipo de pacientes. En este sentido, la técnica de genotipado MIRU-VNTR ha demostrado ser una alternativa rápida y sencilla a la hora de obtener resultados (126, 127) y su nuevo formato de 15 loci (MIRU-15) presenta, además, una capacidad de discriminación semejante a la de la técnica IS6110-RFLP (13, 162). Estudios recientes han puesto de manifiesto que MIRU-15 cumple con los requisitos necesarios para poder ser aplicada en estudios prospectivos, ya que su tiempo de respuesta se adapta a los esquemas reales de intervención epidemiológica (11).

A la hora de realizar estudios de epidemiología molecular, es necesario refinar al máximo el análisis genotípico, con el fin de depurar las cadenas de transmisión para que exista una elevada correlación entre los clústeres identificados y la realidad epidemiológica. En este sentido, nuestro primer interés fue identificar aquellos aspectos que debieran ser considerados/refinados para garantizar solidez en los estudios de epidemiología molecular. Decidimos, por tanto, optimizar: 1) la identificación de falsos diagnósticos de tuberculosis debidos a una contaminación cruzada de laboratorio, ya que conducirían a la identificación de falsos clústeres, y 2) la correlación entre

microepidemias probadas epidemiológicamente y al análisis genotípico de las cepas implicadas.

1.1. Refinamiento metodológico para la identificación rápida de contaminaciones cruzadas de laboratorio

Hasta el momento, IS6110-RFLP ha sido la técnica empleada para resolver las sospechas de contaminación cruzada (34, 64, 202). Sin embargo, la demora en la obtención de RFLP-tipos no permite la identificación precoz de falsos positivos por contaminación cruzada y los resultados no se obtienen en un marco de tiempo aceptable por los microbiólogos y los clínicos para tomar decisiones, con el evidente impacto clínico y epidemiológico que esto supone.

Como se ha comentado anteriormente, la técnica MIRU-VNTR ha demostrado ser una técnica rápida y sencilla para la obtención de genotipos. No obstante, la eficiencia de esta técnica para la identificación de falsos positivos no se ha evaluado mediante ningún análisis prospectivo y sólo existen estudios aislados que documentan su potencial en este contexto (15). Este motivo llevó a valorar, en este trabajo, la capacidad de MIRU-VNTR en la resolución rápida de las sospechas de contaminación cruzada mediante un estudio prospectivo en el que se analizaron, tanto por IS6110-RFLP como por MIRU-VNTR, evaluándose el tiempo de respuesta y la correlación entre ambas técnicas. El objetivo de este estudio fue documentar si la técnica MIRU-VNTR podría ser una buena alternativa para la resolución de estos fenómenos en los laboratorios de genotipado de referencia.

En este sentido, se observó que MIRU-VNTR permitía resolver de manera más rápida que la técnica IS6110-RFLP las sospechas de contaminación cruzada, ya que los resultados se obtuvieron con una media de 27 días de anterioridad. No obstante, cabe resaltar que el tiempo de resolución de las sospechas podría haberse reducido si se hubiera priorizado el análisis por MIRU-VNTR, pero, sin embargo, se prefirió seguir el esquema real de trabajo de un laboratorio de genotipado, en el que se realizan también otros muchos análisis.

Al analizar la correlación con los resultados obtenidos por IS6110-RFLP, se observó que MIRU-VNTR mostraba correlación en todos los casos excepto en uno con la técnica de referencia, a pesar de haberse utilizado para este análisis el set de 12 loci, que ha demostrado ser menos discriminativo que los sets de 15 y 24 loci desarrollados posteriormente. El caso discrepante fue considerado un verdadero positivo por la técnica

IS6110-RFLP, mientras que MIRU-VNTR mostró genotipos idénticos. Un análisis detallado de los RFLP-tipos implicados en esta sospecha de contaminación mostró que las diferencias encontradas podrían deberse a la adquisición, en uno de los casos, de una diana de restricción adicional para la enzima *PvuII*. Otra explicación posible para esta discrepancia sería que el potencial origen de contaminación estuviese coinfectado por dos variantes clonales de IS6110-RFLP y que sólo una de las variantes estuviese participando en el evento de contaminación cruzada.

MIRU-VNTR resolvió casos en los que, debido a un crecimiento insuficiente de los aislados de *M. tuberculosis*, no era posible la obtención de genotipos por la técnica de referencia. Asimismo, permitió la identificación de casos de contaminación cruzada de gran complejidad, con la participación de más de un origen de contaminación, que no hubiesen podido ser resueltos mediante la aplicación de IS6110-RFLP, ya que al analizar los RFLP-tipos de los aislados que constituían las potenciales alertas de contaminación cruzada, estos eran la combinación de los patrones de bandas de sus orígenes de contaminación.

1.2. Análisis refinado de microepidemias no confirmadas por las técnicas de genotipado

En los estudios de epidemiología molecular sólo una parte de los clústeres genotípicos son también identificados durante el estudio convencional de contactos (21, 71, 118, 194). Únicamente en aquellos estudios en los que se ha llevado a cabo un análisis refinado de los clústeres, con determinadas estrategias que incluyen reentrevistas a los pacientes que se encuentran en los mismos, empleando incluso fotografías de los casos implicados en una cadena de transmisión, ha logrado incrementarse el porcentaje de nexos epidemiológicos confirmados entre los casos en cluster identificados por las técnicas de genotipado (141, 200, 223, 240).

Generalmente, el estudio de contactos está basado en el sistema de círculos concéntricos, en el que los contactos más cercanos a un caso de tuberculosis, que suelen ser los familiares y/o personas que conviven con ese paciente, son los primeros en ser investigados. Por tanto, si alguno de los contactos incluidos en el primer círculo resulta positivo para la infección por *M. tuberculosis*, normalmente se asume que ambos constituyen una microepidemia, resultado de la transmisión de una misma cepa. Sin embargo, las técnicas de genotipado han puesto de manifiesto que esto no siempre es así,

y se han observado microepidemias no confirmadas por los datos de genotipado (22, 23). Por esta razón, durante el desarrollo de esta tesis, estas discrepancias han sido reanalizadas detalladamente mediante una estrategia refinada, desde un punto de vista tanto metodológico como analítico, no aplicada con anterioridad para abordar este problema.

La estrategia consistió en reanalizar las microepidemias discrepantes con los datos obtenidos mediante el genotipado con la técnica IS6110-RFLP, apoyándonos en: 1) los datos genotípicos obtenidos por otras dos técnicas de genotipado, Spoligotipado y MIRU-VNTR, esta última de alta capacidad de discriminación, como se ha comentado anteriormente, y 2) el análisis, siempre que fuera posible, de más de una muestra por paciente. La aplicación de técnicas de genotipado de segunda línea, como MIRU-VNTR, ha sido propuesta por algunos autores, como herramienta para ayudar a una identificación más precisa de los casos relacionados epidemiológicamente en los clústeres definidos por IS6110-RFLP (129, 224). Con respecto a la inclusión de más de una muestra por paciente en el análisis, nuestra intención fue valorar la implicación de infecciones complejas clonalmente (coinfecciones) en la posible asignación de patrones genotípicos erróneos, que pudieran ser responsables de las discrepancias con los datos epidemiológicos. El análisis indicó que, para aquellas microepidemias cuyas discrepancias eran debidas a diferencias sutiles entre el patrón genotípico de algún/os caso/s con respecto al resto de los aislados implicados, los resultados obtenidos por los otros dos marcadores utilizados eran idénticos. Estas diferencias pueden ser debidas a que IS6110-RFLP posee una estabilidad menor en comparación con otros marcadores genéticos, ya que algunos autores han estimado que la tasa de cambio de este marcador se sitúa en torno a tres años (65, 253). Además, algunos estudios han sugerido que estas diferencias tan sutiles pueden ser debidas al proceso de adaptación que sufre una cepa cuando infecta a un nuevo hospedador (103).

Gracias a este reanálisis, el número de microepidemias discrepantes se redujo en un 11.4%, poniéndose de manifiesto la necesidad de refinar al máximo el análisis molecular para identificar de manera precisa aquellos casos en los que realmente los datos moleculares difieren de los datos epidemiológicos. No obstante, a pesar de que fue posible reducir el número de casos discrepantes, un porcentaje aún elevado de microepidemias con diferencias genotípicas continuaron sin resolverse. La existencia de estas discrepancias señala la necesidad de ampliar la búsqueda de nexos epidemiológicos

hacia contextos diferentes a los habituales, teniendo en cuenta, además, que en muchas ocasiones la transmisión tiene lugar mediante contactos esporádicos, como ya han revelado diferentes estudios de epidemiología molecular (28, 158, 223), o bien en entornos diferentes a los contemplados habitualmente por la epidemiología convencional.

En este sentido, la exploración de nuevos entornos de transmisión por parte de los epidemiólogos resulta complicada. En el caso de colectivos marginales, la colaboración por parte del paciente es escasa o incluso nula, ya que, en ocasiones, dicha transmisión está asociada a determinados hábitos ilegales. Con respecto a la población inmigrante existe, en ocasiones, una barrera idiomática que impide una correcta comunicación entre el epidemiólogo y el paciente para poder realizar el estudio convencional de contactos. Asimismo, la elevada movilidad existente en estos pacientes dificulta en gran medida la investigación epidemiológica.

Por todas estas razones, es necesario tener en cuenta que se requieren nuevas estrategias epidemiológicas para optimizar el estudio de las cadenas de transmisión en determinados contextos. Estas estrategias deben combinar el análisis molecular con una recolección más refinada de los datos epidemiológicos, así como la exploración de entornos de transmisión no convencionales (141).

2. Optimización de la detección de complejidad clonal y análisis de su implicación clínica y epidemiológica

La complejidad clonal en la infección por *M. tuberculosis* ocurre cuando varias cepas están implicadas en la infección de un mismo paciente. En este sentido, debemos distinguir entre casos con más de un episodio de tuberculosis y casos con un único episodio tuberculoso. En el primer grupo, nos interesan aquellos casos de reinfección exógena, que tiene lugar cuando cepas de *M. tuberculosis* diferentes son aisladas en episodios diferentes de un mismo paciente. En el segundo grupo encontraríamos casos con infección múltiple o policlonal, que ocurre cuando dos cepas distintas de *M. tuberculosis* son aisladas simultáneamente dentro de un mismo episodio. En el caso de la infección múltiple puede ocurrir que, en lugar de dos cepas diferentes, sean aisladas dos variantes clonales de una misma cepa, que únicamente presentan cambios muy sutiles entre sus genotipos. En esta situación se habla de subpoblaciones bacterianas y se

considera que se han generado tras un proceso de microevolución a partir de una cepa inicial.

2.1. Análisis clonal rápido de casos de tuberculosis recurrente

La reinfección exógena es un fenómeno de aceptación creciente y que juega un papel importante en el estudio de las recurrencias, principalmente en las zonas de alta incidencia de tuberculosis, donde puede llegar a ser responsable de más del 70% de las recurrencias (228), aunque también se ha observado en zonas donde la incidencia es baja o moderada y tanto en pacientes VIH-positivos, como VIH-negativos (19, 43, 98). Estas observaciones han conducido a la demanda del clínico de identificar, entre los casos que se presentan con recurrencias, aquellos ocasionados por una reinfección exógena. Inicialmente se asumía que dichas recurrencias se debían a una no adherencia o fracaso terapéutico, por adquisición de resistencias en la cepa causante del primer episodio, y podían conducir a una decisión de modificación terapéutica. Sin embargo, cuando se trata de un caso de reinfección exógena no se deben hacer valoraciones terapéuticas *a priori*, puesto que se trata de una nueva infección independiente.

Generalmente, la caracterización genotípica de recurrencias no se resuelve con rapidez, ya que es necesario realizar un subcultivo del aislado almacenado del primer episodio. Por este motivo, en nuestro estudio quisimos resolver esta limitación aplicando la técnica de MIRU-VNTR al genotipado directo de los aislados congelados procedentes de los episodios de pacientes con tuberculosis recurrente, sin realizar subcultivo del aislado ni purificación del ADN extraído del mismo. Esta técnica demostró ser eficaz a la hora de obtener un genotipo en estas circunstancias y, además, nos permitió documentar fenómenos de complejidad clonal, entre los que se detectaron tres casos de reinfección exógena.

El estudio de recurrencias y el papel que el fenómeno de reinfección exógena juega en él también se ve afectado por la posibilidad de que una reinfección pueda estar causada por una infección independiente que implique a la misma cepa de *M. tuberculosis* que provocó el primer episodio. Este fenómeno es imposible de detectar y, sin embargo, puede ocurrir en regiones donde la incidencia de tuberculosis es muy elevada y existen determinados genotipos prevalentes circulantes en la zona. Por tanto, este hecho debe ser considerado como un posible factor que conduciría a una

subestimación del número de recurrencias que son debidas a una reinfección exógena (228).

2.2 Efecto del cultivo de las muestras clínicas sobre la complejidad clonal de las mismas

El segundo grupo de análisis, las infecciones policlonales en un único episodio, son, sin embargo, un fenómeno que ha sido descrito con mucha menos frecuencia (59, 179, 252). En un estudio realizado en Holanda, donde se genotiparon todos los aislados de *M. tuberculosis* durante trece años, se detectó un único caso de infección mixta (66). Sin embargo, hay que tener en cuenta que en todos estos casos el genotipado fue realizado mediante IS6110-RFLP, en el cual la identificación de infecciones mixtas es complicada e imprecisa puesto que requiere la interpretación de bandas de baja intensidad en los patrones de RFLP. Además, existe la posibilidad que estas bandas de menor intensidad se deban a problemas metodológicos y no a la presencia de una cepa acompañante infrarrepresentada. La interpretación de estas bandas encierra, por tanto, cierta subjetividad y requiere el análisis por personal experto, con la posterior comprobación de los genotipos de cada cepa mediante la obtención de colonias aisladas. Asimismo, hay que tener en cuenta que la detección de infecciones múltiples por la técnica de IS6110-RFLP requiere que ninguna de las cepas esté representada por debajo del 10% en la población bacteriana total (66).

Sin embargo, en estudios posteriores, la utilización de técnicas basadas en PCR ha demostrado un mayor porcentaje de infecciones policlonales (190, 227, 237). En el estudio de Warren *et al.* (237), donde el genotipado fue realizado directamente sobre esputos, este porcentaje llegó al 19% y es posible, además, que esta cifra esté infrarrepresentando el porcentaje total de infecciones mixtas, debido a que la técnica empleada por estos autores únicamente permite diferenciar dos clases de genotipos: genotipo Beijing y no-Beijing.

Lamentablemente, a diferencia de este estudio, las técnicas de genotipado son aplicadas a muestras clínicas que han sido previamente cultivadas, ya que la mayoría de estas técnicas no ofrece la sensibilidad suficiente para ser utilizadas directamente sobre las muestras clínicas. Por tanto, como ya han sugerido otros autores, generalmente, los estudios de genotipado se realizan sin tener en cuenta la posibilidad de que, durante el procedimiento de cultivo, pueda producirse una pérdida de la complejidad clonal de las muestras clínicas (179, 181, 197). En este sentido, el estudio de Shamputa *et al.* (190) ha

demostrado que el análisis de aislados seriados de un mismo paciente, junto con la utilización de la técnica de MIRU-VNTR es una estrategia que ayuda a aumentar la detección de las infecciones policlonales. Asimismo, un estudio realizado en Sudáfrica demostró que, tras aplicar una técnica de genotipado basada en PCR, muchas de las observaciones atribuidas a fenómenos de reinfección, como es el caso de cambios en los patrones de sensibilidad entre aislados de un mismo paciente, eran, en realidad, debidas a infecciones mixtas que no habían sido detectadas por las técnicas de genotipado basadas en IS6110 (227). Estos hallazgos, junto con la interesante observación realizada por el trabajo de du Plessis *et al.* (77), donde se identificaron infecciones policlonales en diferentes lesiones pertenecientes a necropsias, sugieren que el fenómeno de la complejidad clonal podría estar siendo subestimado por los procedimientos microbiológicos llevados a cabo actualmente en los laboratorios de micobacteriología. Por esta razón, otro de los objetivos de esta tesis fue valorar el posible efecto que el cultivo puede tener sobre la complejidad clonal de una muestra clínica. En este sentido, gracias a una aproximación metodológica basada en la técnica de MIRU-VNTR, hemos puesto de manifiesto que, durante el cultivo de las muestras clínicas, se detectan casos en los que se modifica la complejidad clonal de las mismas. Este hallazgo deber ser considerado especialmente a la hora de realizar estudios de genotipado en zonas de alta incidencia de tuberculosis, o de riesgo elevado de sobreexposición, donde la probabilidad de que existan infecciones clonalmente complejas es más alta y, por tanto, la probabilidad de asignación errónea de genotipos es mayor.

Además, en nuestro estudio se puso de manifiesto que algunos de los cambios que se producían tras el cultivo de mezclas con más de una cepa eran muy marcados, puesto que únicamente se detectaba una de las cepas iniciales. En algunos de estos casos, estos cambios podrían ser consecuencia de la mayor tasa de crecimiento observada en algunas de las cepas, confirmándose así la hipótesis planteada por du Plessis *et al.* (77), donde se puntualiza la posibilidad de que el hecho de no encontrar infecciones mixtas en los aislados pertenecientes a zonas de alta incidencia de tuberculosis, podría deberse a que el crecimiento preferente de una de las cepas esté enmascarando una infección policlonal. Sin embargo, en nuestro trabajo, en una parte de los casos no se observó diferencia entre las tasas de crecimiento de las cepas de una misma mezcla, siendo, tal vez, un fenómeno de competición entre dichas cepas el responsable de las diferencias observadas.

Asimismo, también se observaron cambios marcados en mezclas que incluían cepas con distintos perfiles de sensibilidad, siendo la cepa resistente la que era detectada únicamente, o en una proporción más elevada, tras el cultivo. En este sentido, nuestro trabajo apoyaría los resultados obtenidos por otros autores que han observado discrepancias entre el perfil de sensibilidad de las muestras clínicas y el identificado tras el cultivo de las mismas, poniéndose de manifiesto que los aislados clínicos no son un reflejo fiel de la complejidad clonal existente en la muestra clínica (181).

2.3. Impacto de la complejidad clonal en el análisis de la infección por *M. tuberculosis*

La existencia de infecciones clonalmente complejas no detectadas es otro aspecto que ha de ser considerado a la hora de realizar estudios de epidemiología molecular por el impacto que pudiera tener en la asignación incorrecta de genotipos. Este hecho podría conducir a no identificar correctamente todos los miembros de una cadena de transmisión y asignar como un caso huérfano a un paciente que posee una infección policlonal, en la que una de las cepas sí estaría verdaderamente implicada en una cadena de transmisión reciente. La detección de la complejidad clonal presente en las muestras clínicas resulta especialmente importante cuando en dicha complejidad se encuentran implicadas cepas resistentes, debido a la importancia que tiene la identificación de dichas cepas en el estudio de las cadenas de transmisión por la dificultad que requiere el tratamiento de las infecciones causadas por las mismas.

Además de las consecuencias epidemiológicas ya citadas, la infradetección de estas infecciones policlonales puede tener implicaciones clínicas cuando una de las cepas es resistente a alguno de los antimicrobianos. La administración de una pauta de tratamiento estándar eliminaría la cepa sensible, pero la cepa resistente vería favorecido su crecimiento y provocaría la aparición de un segundo episodio (227).

Continuando con el análisis del impacto que pudiera tener la complejidad clonal en diversos niveles de la infección por *M. tuberculosis*, el siguiente aspecto en el que nos centramos integraba los fenómenos de reinfección e infección policlonal, tratados de manera independiente hasta este momento. Así decidimos ver si existía la posibilidad de que algunas infecciones consideradas reinfecciones exógenas fuesen, en realidad, infecciones policlonales en las que ha tenido lugar una alternancia cronológica de las distintas cepas o variantes clonales coinfectantes. Esta selección cronológica de las

distintas cepas podría deberse a que, como se ha citado anteriormente, no siempre los aislados son un reflejo real de la complejidad clonal de la muestra, o podría estar reflejando también una posible competición entre las cepas durante la infección, produciéndose el desplazamiento de una de las cepas con respecto a la otra. En este análisis seguimos el procedimiento metodológico recomendado por otros autores para incrementar la sensibilidad en la detección de la complejidad clonal (190), aplicando la técnica de MIRU-VNTR y, cuando fue posible, genotipando aislados seriados de cada episodio. Sin embargo, en nuestro estudio no fue detectado ningún caso de policlonalidad que pudiese haber sido asignado erróneamente como reinfección exógena, ya que, en todos los casos, solamente se identificó una única cepa en cada episodio. No obstante, hay que tener en cuenta que este estudio ha sido realizado con aislados clínicos cultivados, así que nuevamente surge la duda de, si este mismo análisis hubiese sido realizado en muestras clínicas, la complejidad clonal hubiese sido mayor y nos hubiese permitido identificar la presencia de infecciones policlonales. A pesar de nuestros resultados, debe tenerse en cuenta la importancia de utilizar refinamientos metodológicos que aumenten la detección de la complejidad clonal, principalmente en zonas de alta incidencia, o de mayor riesgo de sobreexposición, donde la probabilidad de que se produzca una infección mixta es mayor.

Independientemente de su mayor o menor frecuencia y de los posibles mecanismos que contribuyen a dificultar su detección, las infecciones con más de una cepa de *M. tuberculosis* pueden deberse a dos causas: la primera de ellas consistiría en la infección simultánea con dos cepas de *M. tuberculosis*, hecho que resulta muy poco probable, aun en zonas de alta incidencia, ya que se requiere que el paciente esté expuesto a una gran concentración ambiental de bacilos pertenecientes a las dos cepas. La segunda causa y tal vez la más probable, es la sobreinfección con una nueva cepa de *M. tuberculosis* tras una primera infección. Atendiendo a cuál es el mecanismo que tiene lugar para que un paciente con una infección mixta desarrolle una tuberculosis activa, el trabajo realizado por du Plessis *et al.* (77) sugiere dos posibilidades: 1) la reactivación endógena de la primera cepa conlleva una reducción de la inmunidad local, que facilita el establecimiento de una segunda infección, o 2) la infección causada por la segunda cepa provoca una cascada de acontecimientos inmunológicos que hacen que se produzca una reactivación de la primera cepa. Ambas hipótesis tienen implicaciones diferentes en

relación con la importancia relativa de los fenómenos de reactivación y reinfección y la patogénesis de la infección secundaria.

3. Análisis de la infectividad de cepas de *M. tuberculosis* con interés epidemiológico y/o clínico

Cuando *M. tuberculosis* entra por primera vez en contacto con un individuo, el sistema inmune de éste desencadena una serie de respuestas que determinarán el curso de la infección. Sólo un 10% de las personas infectadas por este microorganismo desarrollará una tuberculosis activa, así que la compleja interacción que tiene lugar entre el hospedador y la bacteria jugará un papel crucial en el curso clínico de la infección y en sus consecuencias epidemiológicas. Entre los factores que determinan una mayor susceptibilidad para desarrollar una tuberculosis están factores medioambientales, pobreza, malnutrición, hacinamiento y estrés. Además, existe la evidencia de que determinados factores genéticos del hospedador influyen en esta susceptibilidad a *M. tuberculosis*. Entre estos factores, el más estudiado es la respuesta inmune del hospedador frente a la infección por *M. tuberculosis*, pero estudios recientes han demostrado que la variabilidad genética de la bacteria también juega un papel muy importante en el curso de la infección (166). En este sentido, la conjunción de herramientas de genotipado y modelos de infección ha permitido identificar cepas con mayor infectividad y caracterizar, además de los factores del huésped considerados relevantes en la infección, factores bacterianos asimismo determinantes.

El estudio de la infección por *M. tuberculosis* ha puesto de manifiesto que determinadas cepas poseen un interés especial, en el contexto epidemiológico y/o en el contexto clínico. Entre las cepas destacadas por su interés epidemiológico se encuentran: 1) cepas responsables de brotes extensos y de rápida expansión (44, 133, 154), y 2) cepas prevalentes a lo largo del tiempo en una determinada población (131, 134). Además, determinadas cepas también son interesantes desde un punto de vista clínico porque poseen una elevada resistencia a los antimicrobianos (154) o porque muestran una mayor tendencia a la infección extrarrespiratoria (99). Este interés ha llevado al desarrollo de numerosos estudios de infectividad en los que la capacidad de replicación intracelular de

estas cepas, junto con la respuesta inmune provocada por las mismas ha sido analizada, tanto en modelos celulares como en modelos animales.

3.1. Caracterización de la infectividad de aislados pertenecientes a la familia W-Beijing

Entre todas las cepas que presentan interés clínico y epidemiológico, el linaje W-Beijing quizá sea la familia de cepas que mayor interés ha suscitado debido a su amplia distribución mundial y a su gran capacidad de diseminación, generando grandes clústeres que, en ocasiones, han estado asociados a un fenotipo de multirresistencia. Algunos estudios han demostrado que determinadas cepas de esta familia poseen un fenotipo de “hipervirulencia”. Este es el caso de la cepa HN878 cuyo fenotipo “hipervirulento” está caracterizado por una gran capacidad de crecimiento intracelular, así como una elevada y rápida mortalidad observada en el modelo de infección murino. Esta mayor virulencia ha sido asociada a la capacidad de esta cepa de inhibir la respuesta Th1 en los ratones infectados (137), aunque otros autores han asociado este fenotipo “hipervirulento” con una intensa respuesta Th1 inicial, seguida de un rápido descenso de la misma provocado por la producción de citoquinas antiinflamatorias, como IL-10 (217). Sin embargo, estudios de infectividad realizados en modelos celulares han demostrado que no todas las cepas pertenecientes a la familia Beijing poseen una mayor virulencia, ya que diferentes representantes de esta familia han mostrado diferencias en su capacidad de replicación intracelular (214).

En nuestro estudio quisimos caracterizar la infectividad de las cepas pertenecientes a la familia W-Beijing presentes en nuestra muestra. Por esta razón, seleccionamos una serie de aislados que presentaban diferencias en cuanto a su patrón de sensibilidad, estatus huérfano o en cluster, nacionalidad del caso del que se aislaron y número de copias de IS6110. La caracterización de la infectividad se realizó empleando un modelo de infección *in vitro* con la línea celular THP-1 diferenciada a macrófagos, ya que este modelo se considera adecuado para el análisis de la infectividad de *M. tuberculosis* y constituye una buena alternativa al modelo de infección de macrófagos derivados de monocitos humanos (208, 216).

La observación más interesante de nuestros resultados fue la heterogeneidad encontrada en el comportamiento infectivo de los aislados, los cuales exhibieron un amplio rango de tasas de replicación intracelular. Dos aislados difirieron significativamente del resto, mostrando las tasas de replicación intracelular más elevadas. Uno de estos aislados fue pansensible y presentó el menor número de copias de IS6110. Entre los aislados restantes, se observaron tasas de replicación intracelular equivalentes y no se identificaron, además, diferencias significativas con respecto a la cepa control H37Rv. Cuando se analizó la producción de citoquinas durante las infecciones *in vitro*, se observó que las células infectadas con los dos aislados que mostraron las tasas de replicación intracelular más elevadas, producían los niveles más bajos de TNF- α . En estadios tempranos de la infección, estos dos aislados indujeron una producción de TNF- α significativamente menor que se mantuvo así a lo largo de toda la infección. Este hecho indica un fallo en la correcta inducción de una respuesta inmune de tipo Th1. En este sentido y como se ha citado ya anteriormente, otros autores han observado también un amplio rango de tasas de replicación intracelular entre los aislados pertenecientes a la familia W-Beijing y una asociación inversa entre las tasas de replicación intracelular y los niveles de producción de TNF- α (199, 214). Asimismo, las cepas de baja virulencia se han asociado con la inducción de una respuesta inmune más vigorosa, caracterizada por niveles elevados de citoquinas tipo 1 (TNF- α , IFN- γ , IL-12) (135, 215, 217). Estos datos sugieren que la ventaja infectiva de las cepas W-Beijing no debería considerarse como un hecho intrínseco a esta familia, sino como una característica de ciertos representantes. Estos resultados son de gran relevancia, ya que el transcurso de la infección depende de la capacidad de *M. tuberculosis* de regular la producción de citoquinas esenciales para el desarrollo de una respuesta inmune eficiente (55, 74). Como se puede observar en nuestro estudio y como ya han observado otros autores anteriormente, los representantes virulentos de la familia W-Beijing inducen una producción inicial de citoquinas proinflamatorias elevada, que es controlada rápidamente, teniendo lugar una disminución de los niveles de las mismas, lo que supone un control más efectivo de la infección.

Determinados estudios han analizado la relación entre el crecimiento intracelular y la transmisibilidad de determinadas cepas (170, 215, 216, 254), concluyendo que la capacidad de diseminación elevada de una cepa de *M. tuberculosis* se correlaciona con una mayor capacidad de replicación, lo que se considera un marcador de virulencia. Nosotros analizamos los niveles de replicación de cepas transmitidas (cepas en cluster) y

cepas no transmitidas (cepas huérfanas), pero no observamos diferencias significativas en sus tasas de replicación intracelular o en los niveles de producción de TNF- α . Además, los dos aislados con las tasas de replicación más elevadas eran aislados huérfanos, lo que indica que no siempre una mayor virulencia está asociada a una mayor transmisibilidad.

Además, en este sentido, cabe resaltar que en nuestro estudio no se observó una mayor capacidad de replicación o control de la respuesta inmune en el aislado perteneciente al genotipo Beijing causante del brote en la isla de Gran Canaria, con lo que no debería considerarse una cepa especialmente virulenta. Además, la falta de casos secundarios causados por este genotipo en Madrid podría estar indicando que los factores epidemiológicos, más que los factores bacteriológicos, podrían ser las responsables del brote originado en Gran Canaria. El papel específico que estos factores epidemiológicos juegan en diferentes contextos debe clarificarse antes de hacer consideraciones generalizadas acerca de la familia W-Beijing.

3.2 Caracterización de la infectividad de una cepa de *M. tuberculosis* prevalente en Madrid

En nuestro contexto, el rastreo de cepas prevalentes condujo a la identificación de la cepa 5, responsable del cluster con mayor número de casos detectado en la Comunidad de Madrid a lo largo de un período de siete años. Su análisis en el modelo de infección *in vitro* indicó que no presentaba una mayor capacidad de replicación intracelular en comparación con la cepa virulenta de referencia H37Rv. Sin embargo, dicha cepa sí mostró una mayor tasa de replicación intracelular cuando fue comparada con una cepa de genotipo único o “huérfano” que no había generado casos secundarios. Además, H37Rv ha demostrado una elevada virulencia al tener la misma tasa de replicación intracelular, en un modelo de infección de macrófagos activados, que otras cepas consideradas como “hipervirulentas” por su capacidad de causar meningitis tuberculosa (250). La menor capacidad de replicación de la cepa 5 con respecto a H37Rv permite descartar un fenotipo hipervirulento, aunque parece destacar con respecto a una cepa no transmisible en la misma población. Además, puesto que no han sido realizados estudios orientados a medir la respuesta inmune provocada tras la infección de los macrófagos por la Cepa 5, no podemos concluir que no se trate de una cepa especialmente virulenta. En este sentido, Petrelli *et al.* (170) analizaron la virulencia asociada a la cepa causante del cluster mayoritario en una provincia de Canadá, demostrando que la virulencia de dicha

cepa no se debía a una mayor capacidad de replicación intracelular (170), sino que probablemente esté relacionada con su capacidad de inhibir la secreción de citoquinas proinflamatorias (192). Otro punto importante a tener en cuenta es el hecho de que la Cepa 5 pertenece a la subfamilia filogenética RD^{no}, que está distribuida ampliamente a lo largo del mundo y algunos autores han sugerido que esta gran distribución podría ser debida a que posee ciertas características que favorecen su transmisión (101). Quizá estudios posteriores con la cepa 5 puedan revelar ciertas características a nivel genético que estén relacionadas con una mayor capacidad de diseminación.

3.3. Caracterización de la infectividad de cepas implicadas en reinfecciones exógenas

Dentro de las cepas de interés, más allá de los criterios epidemiológicos, decidimos centrarnos en aquellas cepas implicadas en infecciones complejas clonalmente. Nuestro objetivo fue evaluar el papel específico que pueden jugar ciertos factores de la bacteria en el fenómeno de la complejidad clonal durante la infección por *M. tuberculosis*. Existen observaciones, realizadas por autores que han estudiado el fenómeno de reinfección exógena, que sugieren que el fenómeno de la complejidad clonal está asociado a factores socio-epidemiológicos, como la incidencia de tuberculosis, el riesgo de exposición o el estado inmunológico del paciente (59, 84, 204, 228, 235). Sin embargo, estudios realizados con diferentes cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes con infección policlonal compartimentalizada, han demostrado que existe una asociación entre la infectividad de dichas cepas y su capacidad para infectar tejidos extrarrespiratorios, siendo mayor la infectividad de las cepas responsables de la infección extrarrespiratoria (99). Asimismo, otro estudio ha demostrado que, tras infectar ratones con inóculos que incluyen varias cepas de *M. tuberculosis*, existe una dominancia *in vivo* de alguna de las cepas (20).

En este trabajo quisimos analizar más detalladamente si la complejidad clonal en la infección por *M. tuberculosis* es resultado únicamente de factores socio-epidemiológicos o, por el contrario, está asimismo asociada a determinados factores de la bacteria. En concreto, nos centramos en eventos de reinfección exógena, planteándonos si era posible encontrar una infectividad diferente entre las cepas aisladas en el primer episodio, con respecto a las cepas aisladas en el segundo episodio. El análisis de estas cepas en un modelo de infección *in vitro* no permitió encontrar asociación entre la

infectividad de las distintas cepas de *M. tuberculosis* analizadas y el episodio en el que fueron aisladas. Por tanto, no fue posible encontrar la participación de factores bacterianos adicionales a los factores socio-epidemiológicos asumidos como determinantes para que tenga lugar una reinfección. A pesar de todo, hay que tener en cuenta un posible efecto de sesgo en la selección de pacientes, la mayoría de ellos VIH-positivos. En nuestro contexto, al tratarse de una zona donde la incidencia de tuberculosis es baja y el porcentaje de reinfecciones es reducido, la mayoría de estas recurrencias tiene lugar en pacientes inmunocomprometidos, en los cuales la probabilidad de que sean infectados por una segunda cepa y desarrollen una tuberculosis es más elevada, lo que podría estar enmascarando la posible asociación entre factores propios de la bacteria (infectividad) y la implicación en reinfecciones que quizá podría detectarse en una población no comprometida inmunológicamente.

4. Factores genéticos implicados en la infectividad de *M. tuberculosis*

Diferentes estudios han puesto de manifiesto que la discriminación entre cepas de *M. tuberculosis*, facilitada por las técnicas de genotipado, ha conducido a la identificación de diferentes genotipos de alta virulencia (136, 215, 217).

La tecnología de microarrays proporciona una herramienta idónea para analizar cuáles son las causas que determinan los diferentes fenotipos de virulencia observados entre distintas cepas de *M. tuberculosis*, ya que permiten un análisis global del genoma de *M. tuberculosis* para identificar tanto la presencia de determinados polimorfismos asociados a determinados fenotipos de virulencia (174), como aquellos genes expresados diferencialmente por la bacteria y/o la célula hospedadora en respuesta a la infección (92, 173, 178, 188, 213). En este sentido, los estudios de genómica comparativa han permitido identificar regiones de delección exclusivas de las cepas de *M. bovis* BCG y que no se detectan en las cepas patógenas. Asimismo, se han descrito regiones de diferencia entre el genoma de la cepa de referencia H37Rv y su homóloga avirulenta H37Ra (166). Gracias a la identificación de los genes que se encuentran en dichas regiones de diferencia, es posible seleccionar genes candidatos de ser responsables de los fenotipos de virulencia.

4.1. Caracterización genómica y transcriptómica de dos variantes clonales de *M. tuberculosis* con infectividad diferencial

En nuestro caso, se realizó un estudio de genómica comparativa con el fin de poder identificar regiones de diferencia en el genoma de dos variantes clonales de una misma cepa de *M. tuberculosis*, que habían sido aisladas de una misma paciente con tuberculosis respiratoria y meningitis tuberculosa, pero que presentaban comportamientos infectivos diferentes (97). Las diferencias genotípicas existentes entre las dos variantes clonales consistían únicamente en tres bandas de diferencia en sus patrones de RFLP. A pesar de que ambas variantes fueron recuperadas de muestras respiratorias, solo una de ellas se aisló de LCR. El análisis comparativo de sus genomas no reveló la existencia de regiones diferenciales, lo que sugiere que, probablemente, las variaciones genotípicas observadas son tan sutiles, que no llevan asociadas la delección de ninguna región génica. No obstante, no debemos olvidar que este tipo de análisis únicamente permite estudiar y comparar aquellos genes que son comunes a H37Rv, ya que son los genes que se encuentran inmovilizados en el microarray. Podría ocurrir, por tanto, que las diferencias entre los genomas de las dos variantes clonales implicaran a genes que no estuvieran presentes en H37Rv, lo que impediría la caracterización de sus potenciales regiones de diferencia mediante esta estrategia.

A continuación, analizamos si el diferente comportamiento infectivo de las dos variantes clonales pudiera estar asociado a diferencias en sus perfiles de expresión génica. Por este motivo, realizamos un análisis transcriptómico que nos permitiese detectar posibles diferencias en los genes expresados por cada una de ellas durante su crecimiento *in vitro* en el medio de cultivo. Sin embargo, nuevamente, no se observaron diferencias entre los perfiles de expresión de las dos variantes clonales. Teniendo en cuenta la elevada similitud existente entre ambas variantes en todos los aspectos analizados, es posible que sus diferentes comportamientos infectivos resulten de diferencias en los perfiles de expresión génica celular generados por cada una de ellas durante el proceso de infección de la célula hospedadora. Por tanto, serán necesarios estudios posteriores que analicen posibles diferencias a este nivel.

4.2. Caracterización del perfil transcriptómico celular generado tras la infección con una selección de cepas W-Beijing

La interacción inicial entre la micobacteria y el macrófago es la que determinará el curso de la infección. Esta interacción condiciona el perfil de expresión génica tanto de la bacteria como de la célula hospedadora. La activación o inhibición de determinados genes será determinante para que la bacteria logre sobrevivir en el interior del macrófago o para que, por el contrario, el macrófago logre activar correctamente la respuesta inmune que conduce a la eliminación del bacilo. En este sentido, existen diversos componentes de la micobacteria que son reconocidos por determinados receptores del macrófago, generándose una cascada de señalización celular que conllevará, en último término, un cambio en la expresión de determinados genes. Este cambio en el perfil de expresión génica de la célula hospedadora provocará el inicio de los mecanismos orientados a la eliminación del bacilo. Por su parte, la micobacteria ha desarrollado estrategias dirigidas a evitar ser eliminada por la célula hospedadora que, a su vez, pueden ser analizadas atendiendo al cambio en el perfil de expresión génica de la micobacteria.

Existen diversos estudios que han analizado el perfil de expresión de *M. tuberculosis* dentro de la célula hospedadora (92, 188, 213), así como el perfil de expresión de esta última en respuesta a la infección (58, 79, 159, 173, 196, 213, 233), pero debido a las limitaciones que existen a la hora de obtener ARN de las micobacterias intracelulares en cantidad suficiente, los estudios que han analizado la expresión de la célula hospedadora en respuesta a la infección son más numerosos. En todos ellos se ha observado que los principales genes del macrófago que modifican sus niveles de expresión en respuesta a la infección son genes que codifican citoquinas, quimiocinas, moléculas de señalización y proteínas de adhesión y estrés oxidativo (58, 79, 159, 173, 196, 213, 233). Esto ha permitido identificar genes clave en la patogénesis de la bacteria, así como otros implicados en la activación de la respuesta inmune por parte del macrófago. Hay que destacar que todos estos análisis, excepto el estudio realizado por Shuangping *et al.*, han utilizado exclusivamente cepas de referencia de laboratorio (H37Rv y Erdman). Por tanto, a pesar de que numerosos estudios han resaltado la importancia que la variabilidad genética de *M. tuberculosis* tiene sobre su comportamiento infeccioso, aún no ha sido realizado ningún estudio en el que se haya comparado tanto el perfil de expresión de distintas cepas de *M. tuberculosis* al infectar los macrófagos, como la respuesta suscitada en el macrófago tras la infección con diferentes aislados clínicos de *M. tuberculosis*. El análisis del comportamiento que tienen

las distintas cepas en el interior del macrófago, así como el estudio de las respuestas que se generan en esta célula son aspectos muy relevantes para comprender mecanismos clave en el proceso de infección. Asimismo, desde un punto de vista aplicado, estos datos son de gran utilidad a la hora de desarrollar nuevas vacunas o identificar nuevas dianas para nuevos fármacos antimicrobianos. En este sentido, aquellos genes cuya expresión muestra variabilidad en la infección con cepas diferentes no serían buenos candidatos como dianas de antimicrobianos o como antígenos para nuevas vacunas.

Conscientes, por tanto, de la necesidad de no centrarse en cepas de laboratorio al abordar estudios de transcriptómica en tuberculosis, decidimos estudiar el perfil transcriptómico celular generado tras la infección con una selección de cepas W-Beijing de diferente infectividad. Los datos obtenidos han puesto de manifiesto que existen perfiles de expresión comunes a la infección por todas las cepas de *M. tuberculosis*, así como perfiles específicos generados por cada cepa.

4.2.1. Análisis de patrones de expresión comunes en la infección por *M. tuberculosis*

Centrándonos en la pauta de expresión génica celular que se identificaba como compartida por todas las cepas analizadas, al igual que se ha observado en otros estudios (159, 173), se encuentran genes que codifican diversas citoquinas y quimiocinas. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en estos casos, donde predomina un perfil de inducción génica, en nuestro trabajo se observa mayoritariamente un perfil de represión. Entre los genes reprimidos cabe destacar el gen que codifica IL-8, que aparece muy reprimido en todas las situaciones, o el gen de IL-1 β que, exceptuando un caso, se encuentra también reprimido. Estos genes codifican citoquinas de elevada capacidad inflamatoria, con lo que cabe esperar que la represión de los mismos sea un mecanismo utilizado por *M. tuberculosis* para modular la respuesta inmune generada por la célula hospedadora y favorecer, así, su supervivencia en el interior del macrófago. Esta hipótesis se vería apoyada también por el hecho de que el gen de IL-15, citoquina activadora de células T, se encuentra también reprimido en todos los casos. Asimismo, un estudio reciente ha demostrado cómo el gen *zmp1* de *M. tuberculosis* es capaz de inhibir la producción de IL-1 β , lo que impide que tenga lugar la maduración de los fagosomas y disminuye la eliminación de las micobacterias por el macrófago (143). No obstante, debido a las diferentes metodologías empleadas en los diferentes estudios de

transcriptómica que se discutirán más adelante, resulta difícil comparar entre sí los resultados obtenidos en ellos.

En el perfil de expresión común generado por todas las cepas de *M. tuberculosis*, junto con los genes que codifican diversas citoquinas y quimiocinas, se observa también la expresión diferencial de genes implicados en el tráfico intracelular, rutas de señalización y estrés oxidativo, al igual que ocurre en el estudio realizado por Tailleux *et al.* (213). Cabe destacar aquí la elevada represión del gen MAP3K8 que tiene lugar en todos los casos. Este gen codifica una proteína implicada en la ruta de señalización de las MAP-quinasas, cuya activación conduce, en último término, a la expresión de citoquinas proinflamatorias y moléculas antimicrobianas, así como a la inducción de la apoptosis. El bloqueo de esta ruta por *M. tuberculosis* parece estar indicando nuevamente una modulación por parte de la micobacteria del perfil transcriptómico de la célula hospedadora, con el fin de garantizar su supervivencia intracelular.

4.2.2. Análisis de patrones de expresión específicos en la infección por cepas de *M. tuberculosis* pertenecientes a la familia W-Beijing

Tras haber analizado los aspectos comunes que identificábamos entre los perfiles de expresión génica celular obtenidos a partir de diferentes cepas, decidimos explorar si era posible identificar pautas específicas para cada cepa o tipo de cepas.

Inicialmente se analizó el perfil transcriptómico común a la infección por todas las cepas Beijing. Sin embargo, se observó que únicamente un número muy reducido de genes se expresaba de modo equivalente en todas ellas, entre los que se encontraban genes que codifican la caspasa10, la IL-24 y diversas proteínas de choque térmico. Esta observación apunta a una heterogeneidad en cuanto a la familia W-Beijing desde el punto de vista de las respuestas celulares inducidas tras la infección por diferentes representantes de este linaje. El concepto de homogeneidad dentro de este linaje, inicialmente considerado como asociado a virulencia, transmisibilidad y resistencia (26, 102) se ha debilitado progresivamente para dar paso a la idea de que se deben esperar diferentes fenotipos dentro de una familia amplia. En este sentido, inicialmente se consideró que esta familia estaba asociada a una mayor tendencia a desarrollar resistencia o multirresistencia. Sin embargo, a pesar de que diversos estudios han demostrado una relación significativa entre la familia W-Beijing y la resistencia a fármacos (27, 70, 128), otros autores, por el contrario, no han observado una mayor resistencia entre estas cepas

comparadas con el resto de las cepas aisladas en las mismas regiones (44, 57). Asimismo, como se ha comentado anteriormente, también se ha observado un comportamiento infeccioso heterogéneo en esta familia de cepas (199, 214).

En estudios realizados con otros patógenos se ha sugerido que mecanismos diferentes de regulación de la respuesta del hospedador podrían ser responsables de diferencias en los perfiles de infectividad de dichos patógenos. Este es el caso del estudio realizado por Mogensen *et al.* (151), donde se pone de manifiesto cómo diferencias observadas en la patogenicidad de dos cepas diferentes de *Neisseria meningitidis* podrían estar asociadas a su diferente capacidad para generar una respuesta inflamatoria a través de la ruta de señalización de TLR4. Basándonos en estas observaciones, quisimos analizar si el diferente comportamiento infeccioso observado en las dos cepas Beijing de mayor virulencia podría ser el resultado de un mecanismo de regulación común, por parte de estas dos cepas, del perfil de expresión del macrófago. Por esta razón, tras el análisis general con cepas Beijing, se estudió el perfil de expresión común para los dos aislados de esta familia que mostraron una infectividad *in vitro* elevada. Al comparar este perfil con el obtenido con la cepa Beijing de baja infectividad, de nuevo, fue posible identificar un número muy reducido de genes que se expresaba de modo diferencial en la infección con las cepas más infectivas. La mayor parte de estos genes son de respuesta a estrés y a estímulos, como son el gen que codifica la proteína de choque térmico de 90 kDa o el que codifica la fibronectina 1. Además, a pesar de las distintas categorías funcionales en las que se encuentran agrupados, ocurre frecuentemente que un mismo gen se encuentra en más de una de estas categorías. El reducido número de genes cuyo patrón de expresión es compartido por la infección con las cepas de alta virulencia parece sugerir que la mayor virulencia observada en dichas cepas no se debe a que compartan un modo equivalente de control de la expresión génica de la célula hospedadora, sino que cada una de ellas explora vías independientes de interacción con el macrófago, generándose en éste respuestas diferentes.

4.2.3. Análisis de patrones de expresión singulares de cepa en la infección por *M. tuberculosis*

Una vez documentada la escasa rentabilidad de intentar identificar perfiles de expresión comunes a la familia Beijing e incluso a algunos de sus representantes de alta virulencia, decidimos focalizar el estudio a la identificación de aspectos de interés

desvelados singularmente por alguna/s cepa/s. En este sentido, una observación destacable es el hecho de que uno de los genes que codifica el receptor “scavenger” MSR1 se encuentra muy inducido en todos los casos, a excepción de las células infectadas con la cepa Beijing de menor infectividad, donde este gen presenta un inducción muy débil. Además, la inducción de este gen es especialmente elevada tras la infección con las dos cepas Beijing de mayor virulencia.

En este sentido, los receptores “scavenger” han sido propuestos como unos de los receptores claves para la entrada de *M. tuberculosis* en el macrófago (171), con lo que una menor expresión de este gen llevaría asociada una menor cantidad de receptores para *M. tuberculosis* en la superficie celular y, con ello, una menor entrada de micobacterias en la célula. Quizá este hecho ayudaría a explicar la menor infectividad observada en la cepa Beijing 5, ya que, al no producirse un aumento de estos receptores en la superficie del macrófago, entrarían menos micobacterias en su interior.

Al analizar la expresión del gen de TNF- α , en tres de los casos este gen se encuentra reprimido y no cambia su expresión tras la infección con la cepa 7. Sin embargo, en el ensayo de infectividad *in vitro* se había observado que únicamente las cepas que mostraron una mayor replicación intracelular eran capaces de contener la producción de TNF- α . La no detección de diferencias claras en los niveles de expresión de este gen entre las células infectadas con las cepas de mayor virulencia y las infectadas con las otras dos cepas, podría deberse a que, el momento en el que se midieron estos niveles (a las 18 horas tras la infección), no nos permite detectar diferencias producidas por cada cepa en los niveles de expresión de este gen. En este sentido, en el estudio realizado por Ragno *et al.* (173) se observa que la inducción del gen de TNF- α tiene lugar únicamente seis horas después de producirse la infección y, pasado este tiempo, se recuperan los niveles basales. Es posible que, en nuestro caso, los niveles de expresión de este gen a las seis horas de infección hubieran puesto de manifiesto una inducción inicial de TNF- α por parte de las cepas menos infectivas, mientras que las cepas de mayor virulencia hubieran provocado una represión de este gen desde el inicio de la infección.

En el perfil transcriptómico generado por la cepa 4, cabe resaltar una gran inducción tanto del gen que codifica para IgG, como de los genes que codifican algunos de sus receptores. Este hecho podría estar indicando que el perfil de expresión de la célula hospedadora se inclinaría hacia la generación de una respuesta inmune humoral o Th2, lo que facilitaría la supervivencia intracelular de esta cepa.

Resulta también interesante la observación de que el gen de IL-10, que se encuentra reprimido en el resto de los casos, tras la infección por la cepa 4 su expresión se mantiene, lo que podría indicar que existe también una secreción basal de esta citoquina. La producción temprana de citoquinas antiinflamatorias ha sido propuesta, por algunos autores, como un mecanismo de virulencia que inhibe la producción de IFN- γ y con ello la activación de los macrófagos (136, 214).

Asimismo, tras la infección con la cepa 4, se observa una fuerte inducción del gen que codifica la defensina β 1, que pertenece a una familia de péptidos con actividad microbicida y citotóxica. Se ha sugerido que estos péptidos son un componente importante de los mecanismos de respuesta innatos generados contra *M. tuberculosis* (109). En este sentido, se ha documentado que monocitos humanos transfectados con este tipo de defensinas controlan mejor el crecimiento de la micobacteria (124). Teniendo en cuenta estos hallazgos, la elevada inducción provocada por la cepa 4 podría estar indicando un mecanismo de defensa desarrollado por el macrófago en respuesta a la elevada infectividad de esta cepa.

En el caso de la cepa 7 resulta de interés la gran inducción que se produce en los genes MMP1 y MMP12. Estos genes codifican metalopeptidasas, que son proteínas que degradan la matriz extracelular y contribuyen a la degradación de los tejidos. Se ha observado que la expresión y la secreción de MMP1 está inducida por *M. tuberculosis*, a través de una ruta de transducción en la que están implicadas MAP-quinasas (175). Sin embargo, se ha descrito también que MMP12 tiene efectos antimicrobianos al adherirse a la pared celular bacteriana y desorganizar las membranas celulares (114). La gran inducción que tiene lugar en la célula hospedadora tras la infección por esta cepa podría interpretarse como un mecanismo de defensa especialmente activado como resultado de la infectividad elevada de esta cepa.

Otro aspecto destacable al analizar el perfil transcriptómico generado tras la infección por la cepa 7 es el hecho de que el gen de IL-1 β esté inducido, ya que al tratarse de una citoquina proinflamatoria, mediante su acción el crecimiento intracelular de esta cepa no se vería favorecido. Sin embargo, en paralelo se observa la inducción del gen que codifica su receptor antagonista, que podría inhibir el efecto antibacteriano de IL-1 β .

Por último, la fuerte represión que se observa en el gen que codifica el IFN- β 2 tras la infección con el resto de las cepas, no se observa en el caso de la cepa 7, donde

existen niveles basales de expresión de este gen. Esta observación podría estar indicando que existe cierta secreción de esta citoquina por parte del macrófago. El IFN- β 2 está implicado en la maduración de células B, es decir, en la generación de una respuesta adaptativa Th2. Asimismo, un estudio realizado por Manca *et al.* (138) ha demostrado que cepas hipervirulentas de la familia W-Beijing inducen la expresión de este tipo de interferones y este hecho lleva asociado una menor producción de TNF- α e IL-12, así como una menor activación de células T.

4.2.4. Limitaciones existentes en el análisis de la expresión génica

A pesar de que el análisis de la expresión génica es una herramienta útil que ayuda a comprender, en cierta medida, el diferente comportamiento infeccioso observado entre distintas cepas de *M. tuberculosis*, así como a identificar genes que pudieran estar favoreciendo la supervivencia intracelular del bacilo, existen ciertas limitaciones en este tipo de análisis que deben considerarse.

En primer lugar, es necesario tener en cuenta que entre estos estudios existen diferencias metodológicas y analíticas en cuanto al tipo de macrófago utilizado (humano, murino o línea celular), la multiplicidad de infección utilizada, el momento en el que se analizan los resultados tras la infección o el número de genes analizados. En este sentido, hay que tener en cuenta que el perfil de expresión de una célula es muy sensible a modificaciones experimentales sutiles, con lo que cambios en el número de bacterias o en el tiempo de infección provocan alteraciones marcadas en la expresión de muchos genes. Además, existen diversos tipos de microarrays, tanto murinos como humanos, y no todos analizan el mismo número de genes, ya que algunos están dirigidos solamente a analizar un grupo concreto de genes implicados en funciones específicas o pertenecientes a familias funcionales determinadas. Todas estas variables hacen que existan diferencias, en los perfiles de expresión del macrófago en respuesta a la infección por *M. tuberculosis* propuestos en diferentes estudios.

También es necesario establecer un consenso en cuanto al análisis estadístico que se realiza de los datos obtenidos de los microarrays y a los diferentes criterios de inclusión o exclusión de los genes utilizados por los distintos autores. Además, otro aspecto que ha de ser considerado es que en el análisis realizado con microarrays sólo son tenidos en cuenta los genes expresados diferencialmente, mientras que los genes expresados constitutivamente son ignorados por completo, aunque su papel en la

infección puede ser igualmente importante. Asimismo, el significado que tiene un cambio en el nivel de expresión de un gen puede ser muy diferente para las distintas proteínas y existen genes que son regulados de manera simultánea.

Hay que tener en cuenta, por tanto, que a pesar que la visión global que proporcionan los microarrays en cuanto al comportamiento de los genes, estos deben ser vistos como herramientas generadoras de hipótesis para posteriores estudios y para la selección de genes específicos que serán estudiados en profundidad posteriormente con la aplicación de otras técnicas, que permitan establecer, de forma precisa, cuál es el mecanismo concreto de regulación de ese gen.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. MIRU-VNTR es una técnica rápida, sencilla y más adecuada que la técnica IS61610-RFLP para la resolución de sospechas de contaminación cruzada en los laboratorios de micobacteriología.
2. El análisis molecular de los casos en cluster ha de refinarse al máximo mediante la utilización de técnicas de genotipado adicionales al RFLP y el análisis, cuando sea posible, de más de un aislado por paciente. Este refinamiento ayudará a identificar de manera más precisa las discrepancias reales entre las técnicas de genotipado y el estudio convencional de contactos.
3. Es necesario ampliar la búsqueda de nexos epidemiológicos hacia contextos diferentes de los habituales, con el fin de reducir el número de microepidemias con discrepancias genotípicas.
4. MIRU-VNTR es una técnica rápida y sensible para la obtención de genotipos directamente de aislados de *M. tuberculosis* archivados, pudiendo ser aplicada para realizar un análisis clonal rápido de los aislados de pacientes con tuberculosis recurrente.
5. La complejidad clonal inicial de *M. tuberculosis* presente en las muestras clínicas puede verse modificada tras el cultivo de las mismas. Es necesario, por tanto, optimizar las técnicas de genotipado para que puedan aplicarse directamente al análisis de las muestras clínicas y establecer, así, la dimensión real de la complejidad clonal en la infección por *M. tuberculosis*.
6. En nuestro contexto es improbable que las reinfecciones sean resultado de infecciones policlonales con alternancia cronológica diferencial de las cepas coinfectantes.
7. En las reinfecciones exógenas no se observó que haya participación de factores bacterianos, como la infectividad de la cepa.

8. La cepa 5 es la cepa más prevalente en nuestro contexto, siendo responsable de un 3.7% del total de casos de tuberculosis durante el período 1997-2004. Se trata de una cepa de elevada homogeneidad genotípica y que no destaca por su virulencia.
9. La caracterización de dos variantes clonales de *M. tuberculosis* de diferente comportamiento infectivo, no identificó diferencias a nivel genómico o transcriptómico que pudieran explicar su fenotipo.
10. La infectividad de las cepas pertenecientes a la familia W-Beijing presentes en nuestra muestra es heterogénea. Las cepas con tasas de replicación intracelular significativamente más elevadas son, a su vez, aquellas que contienen la producción de TNF- α desde el inicio de la infección.
11. El análisis del perfil transcriptómico celular generado tras la infección con una selección de cepas de *M. tuberculosis* desveló que existen perfiles de expresión comunes a la infección por este patógeno. En este perfil de expresión común se encuentran genes que codifican citoquinas, quimiocinas, y moléculas implicadas en el tráfico intracelular, rutas de señalización y estrés oxidativo.
12. El perfil transcriptómico celular generado tras la infección por una selección de cepas W-Beijing presenta un número reducido de genes en común, predominando perfiles de expresión específicos de cada cepa. La elevada virulencia observada en dos representantes de esta familia no se debe, por tanto, a que modulen de manera común la expresión génica de la célula hospedadora.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Centro de Prevención y Control de la Tuberculosis. Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat Direcció General de salut Pública.** 1998. Manual de Prevención de la Tuberculosis. Estudio Convencional de Contactos y Quimioprofilaxis Antituberculosa. ISBN: 84-482-1998-0. Depòsit Legal: V-4951-1998.
2. **Centro Nacional de Epidemiología Instituto de Salud Carlos III.** Casos de tuberculosis declarados a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica .España, 2007. Vol. 16 nº 20/229-240. ISSN: 1135 - 6286. 2008.
3. **Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children.** This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. 2000. Am J Respir Crit Care Med **161**:1376-95.
4. **Guidelines for the investigation of contacts of persons with infectious tuberculosis.** Recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC. 2005. MMWR Recomm Rep **54**:1-47.
5. Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis among HIV-infected persons--Florida and New York, 1988-1991. 1991. MMWR Morb Mortal Wkly Rep **40**:585-91.
6. **Aaron, L., D. Saadoun, I. Calatroni, O. Launay, N. Memain, V. Vincent, G. Marchal, B. Dupont, O. Bouchaud, D. Valeyre, and O. Lortholary.** 2004. Tuberculosis in HIV-infected patients: a comprehensive review. Clin Microbiol Infect **10**:388-98.
7. **Agerton, T. B., S. E. Valway, R. J. Blinkhorn, K. L. Shilkret, R. Reves, W. W. Schluter, B. Gore, C. J. Pozsik, B. B. Plikaytis, C. Woodley, and I. M. Onorato.** 1999. Spread of strain W, a highly drug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*, across the United States. Clin Infect Dis **29**:85-92; discussion 93-5.
8. **Aguilar, D., E. Infante, C. Martin, E. Gormley, B. Gicquel, and R. Hernandez Pando.** 2007. Immunological responses and protective immunity against tuberculosis conferred by vaccination of Balb/C mice with the attenuated *Mycobacterium tuberculosis* (phoP) SO2 strain. Clin Exp Immunol **147**:330-8.
9. **Al-Orainey, I. O.** 2009. Diagnosis of latent tuberculosis: Can we do better? Ann Thorac Med **4**:5-9.
10. **Alcaide Fernández de Vega, F., Esteban Moreno, J., González Martín, J., Palacios Gutiérrez, J.J.** 2005. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 9-a Micobacterias. Emilia Cercenado y Rafael Cantón.
11. **Alonso-Rodríguez, N., M. Martínez-Lirola, M. L. Sanchez, M. Herranz, T. Penafiel, C. Bonillo Mdel, M. Gonzalez-Rivera, J. Martinez, T. Cabezas, L. F. Diez-Garcia, E. Bouza, and D. G. de Viedma.** 2009. 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 **47**:2026-32.
12. **Alonso Rodriguez, N., F. Chaves, J. Inigo, E. Bouza, D. Garcia de Viedma, S. Andres, R. Cias, R. Daza, D. Domingo, J. Esteban, J. Garcia, E. Gomez Mampaso, M. Herranz, E. Palenque, and M. J. Ruiz Serrano.** 2009.

- Transmission permeability of tuberculosis involving immigrants, revealed by a multicentre analysis of clusters. *Clin Microbiol Infect* **15**:435-42.
13. **Allix-Beguec, C., M. Fauville-Dufaux, and P. Supply.** 2008. Three-year population-based evaluation of standardized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **46**:1398-406.
 14. **Allix-Beguec, C., D. Harmsen, T. Weniger, P. Supply, and S. Niemann.** 2008. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* **46**:2692-9.
 15. **Allix, C., P. Supply, and M. Fauville-Dufaux.** 2004. Utility of fast mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat genotyping in clinical mycobacteriological analysis. *Clin Infect Dis* **39**:783-9.
 16. **Anh, D. D., M. W. Borgdorff, L. N. Van, N. T. Lan, T. van Gorkom, K. Kremer, and D. van Soolingen.** 2000. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype emerging in Vietnam. *Emerg Infect Dis* **6**:302-5.
 17. **Ardito, F., B. Posteraro, M. Sanguinetti, S. Zanetti, and G. Fadda.** 2001. Evaluation of BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT 960) automated system for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **39**:4440-4.
 18. **Ausina, V., Rufi, G., Moreno, S.** 2006. Tuberculosis, p. 495-515, Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editorial Médica Panamericana.
 19. **Bandera, A., A. Gori, L. Catozzi, A. Degli Esposti, G. Marchetti, C. Molteni, G. Ferrario, L. Codecasa, V. Penati, A. Matteelli, and F. Franzetti.** 2001. Molecular epidemiology study of exogenous reinfection in an area with a low incidence of tuberculosis. *J Clin Microbiol* **39**:2213-8.
 20. **Barczak, A. K., P. Domenech, H. I. Boshoff, M. B. Reed, C. Manca, G. Kaplan, and C. E. Barry, 3rd.** 2005. In vivo phenotypic dominance in mouse mixed infections with *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Infect Dis* **192**:600-6.
 21. **Barnes, P. F., and M. D. Cave.** 2003. Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med* **349**:1149-56.
 22. **Behr, M. A., P. C. Hopewell, E. A. Paz, L. M. Kawamura, G. F. Schecter, and P. M. Small.** 1998. Predictive value of contact investigation for identifying recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med* **158**:465-9.
 23. **Bennett, D. E., I. M. Onorato, B. A. Ellis, J. T. Crawford, B. Schable, R. Byers, J. S. Kammerer, and C. R. Braden.** 2002. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from epidemiologically linked case pairs. *Emerg Infect Dis* **8**:1224-9.
 24. **Betts, J. C., P. T. Lukey, L. C. Robb, R. A. McAdam, and K. Duncan.** 2002. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol* **43**:717-31.
 25. **Bhattacharya, M., S. Dietrich, L. Mosher, F. Siddiqui, B. E. Reisberg, W. S. Paul, and J. R. Warren.** 1998. Cross-contamination of specimens with *Mycobacterium tuberculosis*: clinical significance, causes, and prevention. *Am J Clin Pathol* **109**:324-30.

26. **Bifani, P. J., B. Mathema, N. E. Kurepina, and B. N. Kreiswirth.** 2002. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol* **10**:45-52.
27. **Bifani, P. J., B. B. Plikaytis, V. Kapur, K. Stockbauer, X. Pan, M. L. Lutfey, S. L. Moghazeh, W. Eisner, T. M. Daniel, M. H. Kaplan, J. T. Crawford, J. M. Musser, and B. N. Kreiswirth.** 1996. Origin and interstate spread of a New York City multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family. *Jama* **275**:452-7.
28. **Bock, N. N., J. P. Mallory, N. Mobley, B. DeVoe, and B. B. Taylor.** 1998. Outbreak of tuberculosis associated with a floating card game in the rural south: lessons for tuberculosis contact investigations. *Clin Infect Dis* **27**:1221-6.
29. **Bodenmann, P., P. Vaucher, H. Wolff, B. Favrat, F. de Tribolet, E. Masserey, and J. P. Zellweger.** 2009. Screening for latent tuberculosis infection among undocumented immigrants in Swiss healthcare centres; a descriptive exploratory study. *BMC Infect Dis* **9**:34.
30. **Bogdan, C., Y. Vodovotz, and C. Nathan.** 1991. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med* **174**:1549-55.
31. **Borrell, S., M. Espanol, A. Orcau, G. Tudo, F. March, J. A. Cayla, J. M. Jansa, F. Alcaide, N. Martin-Casabona, M. Salvado, J. A. Martinez, R. Vidal, F. Sanchez, N. Altet, E. Rey, P. Coll, and J. Gonzalez-Martin.** 2009. Tuberculosis transmission patterns among Spanish-born and foreign-born populations in the city of Barcelona. *Clin Microbiol Infect*.
32. **Braden, C. R., G. P. Morlock, C. L. Woodley, K. R. Johnson, A. C. Colombel, M. D. Cave, Z. Yang, S. E. Valway, I. M. Onorato, and J. T. Crawford.** 2001. Simultaneous infection with multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Infect Dis* **33**:e42-7.
33. **Braden, C. R., G. L. Templeton, M. D. Cave, S. Valway, I. M. Onorato, K. G. Castro, D. Moers, Z. Yang, W. W. Stead, and J. H. Bates.** 1997. Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a state with a large rural population. *J Infect Dis* **175**:1446-52.
34. **Braden, C. R., G. L. Templeton, W. W. Stead, J. H. Bates, M. D. Cave, and S. E. Valway.** 1997. Retrospective detection of laboratory cross-contamination of *Mycobacterium tuberculosis* cultures with use of DNA fingerprint analysis. *Clin Infect Dis* **24**:35-40.
35. **Breitling, R., P. Armengaud, A. Amtmann, and P. Herzyk.** 2004. Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Lett* **573**:83-92.
36. **Brewin, P., A. Jones, M. Kelly, M. McDonald, E. Beasley, P. Sturdy, G. Bothamley, and C. Griffiths.** 2006. Is screening for tuberculosis acceptable to immigrants? A qualitative study. *J Public Health (Oxf)* **28**:253-60.
37. **Brosch, R., S. V. Gordon, M. Marmiesse, P. Brodin, C. Buchrieser, K. Eiglmeier, T. Garnier, C. Gutierrez, G. Hewinson, K. Kremer, L. M. Parsons, A. S. Pym, S. Samper, D. van Soolingen, and S. T. Cole.** 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:3684-9.
38. **Brudey, K., J. R. Driscoll, L. Rigouts, W. M. Prodinger, A. Gori, S. A. Al-Hajoj, C. Allix, L. Aristimuno, J. Arora, V. Baumanis, L. Binder, P. Cafrune, A. Cataldi, S. Cheong, R. Diel, C. Ellermeier, J. T. Evans, M.**

- Fauville-Dufaux, S. Ferdinand, D. Garcia de Viedma, C. Garzelli, L. Gazzola, H. M. Gomes, M. C. Gutierrez, P. M. Hawkey, P. D. van Helden, G. V. Kadival, B. N. Kreiswirth, K. Kremer, M. Kubin, S. P. Kulkarni, B. Liens, T. Lillebaek, M. L. Ho, C. Martin, C. Martin, I. Mokrousov, O. Narvskaja, Y. F. Ngeow, L. Naumann, S. Niemann, I. Parwati, Z. Rahim, V. Rasolofon-Razanamparany, T. Rasolonavalona, M. L. Rossetti, S. Rusch-Gerdes, A. Sajduda, S. Samper, I. G. Shemyakin, U. B. Singh, A. Somoskovi, R. A. Skuce, D. van Soolingen, E. M. Streicher, P. N. Suffys, E. Tortoli, T. Tracevska, V. Vincent, T. C. Victor, R. M. Warren, S. F. Yap, K. Zaman, F. Portaels, N. Rastogi, and C. Sola. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol* 6:23.
39. **Brudney, K., and J. Dobkin.** 1991. Resurgent tuberculosis in New York City. Human immunodeficiency virus, homelessness, and the decline of tuberculosis control programs. *Am Rev Respir Dis* 144:745-9.
 40. **Burman, W. J., and R. R. Reves.** 2000. Review of false-positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis* and recommendations for avoiding unnecessary treatment. *Clin Infect Dis* 31:1390-5.
 41. **Butcher, P. D.** 2004. Microarrays for *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 84:131-7.
 42. **Cain, K. P., S. R. Benoit, C. A. Winston, and W. R. Mac Kenzie.** 2008. Tuberculosis among foreign-born persons in the United States. *Jama* 300:405-12.
 43. **Caminero, J. A., M. J. Pena, M. I. Campos-Herrero, J. C. Rodriguez, O. Afonso, C. Martin, J. M. Pavon, M. J. Torres, M. Burgos, P. Cabrera, P. M. Small, and D. A. Enarson.** 2001. Exogenous reinfection with tuberculosis on a European island with a moderate incidence of disease. *Am J Respir Crit Care Med* 163:717-20.
 44. **Caminero, J. A., M. J. Pena, M. I. Campos-Herrero, J. C. Rodriguez, I. Garcia, P. Cabrera, C. Lafoz, S. Samper, H. Takiff, O. Afonso, J. M. Pavon, M. J. Torres, D. van Soolingen, D. A. Enarson, and C. Martin.** 2001. Epidemiological evidence of the spread of a *Mycobacterium tuberculosis* strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island. *Am J Respir Crit Care Med* 164:1165-70.
 45. **Cardona, P. J.** 2009. A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection. *Infection* 37:80-6.
 46. **Casper, C., S. P. Singh, S. Rave, C. L. Daley, G. S. Schecter, L. W. Riley, B. N. Kreiswirth, and P. M. Small.** 1996. The transcontinental transmission of tuberculosis: A molecular epidemiological assessment. *Am J Public Health* 86:551-3.
 47. **Castro, K. G., and H. W. Jaffe.** 2002. Rationale and methods for the National Tuberculosis Genotyping and Surveillance Network. *Emerg Infect Dis* 8:1188-91.
 48. **Clancy, L.** 1990. Infectiousness of tuberculosis. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis* 65:70.
 49. **Clark, C. M., C. R. Driver, S. S. Munsiff, J. R. Driscoll, B. N. Kreiswirth, B. Zhao, A. Ebrahimzadeh, M. Salfinger, A. S. Piatek, and J. Abdelwahab.** 2006. Universal genotyping in tuberculosis control program, New York City, 2001-2003. *Emerg Infect Dis* 12:719-24.

50. **Clay, H., H. E. Volkman, and L. Ramakrishnan.** 2008. Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death. *Immunity* **29**:283-94.
51. **Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, 3rd, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, and B. G. Barrell.** 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**:537-44.
52. **Corbett, E. L., C. J. Watt, N. Walker, D. Maher, B. G. Williams, M. C. Raviglione, and C. Dye.** 2003. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med* **163**:1009-21.
53. **Cosma, C. L., D. R. Sherman, and L. Ramakrishnan.** 2003. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annu Rev Microbiol* **57**:641-76.
54. **Curtis, A. B., R. Ridzon, L. F. Novick, J. Driscoll, D. Blair, M. Oxtoby, M. McGarry, B. Hiscox, C. Faulkner, H. Taber, S. Valway, and I. M. Onorato.** 2000. Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* transmission patterns in a homeless shelter outbreak. *Int J Tuberc Lung Dis* **4**:308-13.
55. **Chacon-Salinas, R., J. Serafin-Lopez, R. Ramos-Payan, P. Mendez-Aragon, R. Hernandez-Pando, D. Van Soolingen, L. Flores-Romo, S. Estrada-Parra, and I. Estrada-Garcia.** 2005. Differential pattern of cytokine expression by macrophages infected in vitro with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol* **140**:443-9.
56. **Chan, J., Y. Xing, R. S. Magliozzo, and B. R. Bloom.** 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med* **175**:1111-22.
57. **Chan, M. Y., M. Borgdorff, C. W. Yip, P. E. de Haas, W. S. Wong, K. M. Kam, and D. Van Soolingen.** 2001. Seventy percent of the *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong represent the Beijing genotype. *Epidemiol Infect* **127**:169-71.
58. **Chaussabel, D., R. T. Semnani, M. A. McDowell, D. Sacks, A. Sher, and T. B. Nutman.** 2003. Unique gene expression profiles of human macrophages and dendritic cells to phylogenetically distinct parasites. *Blood* **102**:672-81.
59. **Chaves, F., F. Dronda, M. Alonso-Sanz, and A. R. Noriega.** 1999. Evidence of exogenous reinfection and mixed infection with more than one strain of *Mycobacterium tuberculosis* among Spanish HIV-infected inmates. *Aids* **13**:615-20.
60. **Chaves, F., F. Dronda, A. Ortega, M. Alonso-Sanz, L. Lopez-Cubero, A. Gonzalez-Lopez, and S. Catalan.** 1995. [Resistant tuberculosis in a prison population during 1991-1993]. *Med Clin (Barc)* **104**:85-8.
61. **Dahle, U. R., V. Eldholm, B. A. Winje, T. Mannsaker, and E. Heldal.** 2007. Impact of immigration on the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in a low-incidence country. *Am J Respir Crit Care Med* **176**:930-5.
62. **Daley, C. L., P. M. Small, G. F. Schecter, G. K. Schoolnik, R. A. McAdam, W. R. Jacobs, Jr., and P. C. Hopewell.** 1992. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human

- immunodeficiency virus. An analysis using restriction-fragment-length polymorphisms. *N Engl J Med* **326**:231-5.
63. **Davis, J. M., and L. Ramakrishnan.** 2009. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell* **136**:37-49.
 64. **de Boer, A. S., B. Blommerde, P. E. de Haas, M. M. Sebek, K. S. Lambregts-van Weezenbeek, M. Dessens, and D. van Soolingen.** 2002. False-positive *Mycobacterium tuberculosis* cultures in 44 laboratories in The Netherlands (1993 to 2000): incidence, risk factors, and consequences. *J Clin Microbiol* **40**:4004-9.
 65. **de Boer, A. S., M. W. Borgdorff, P. E. de Haas, N. J. Nagelkerke, J. D. van Embden, and D. van Soolingen.** 1999. Analysis of rate of change of IS6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based on serial patient isolates. *J Infect Dis* **180**:1238-44.
 66. **de Boer, A. S., K. Kremer, M. W. Borgdorff, P. E. de Haas, H. F. Heersma, and D. van Soolingen.** 2000. Genetic heterogeneity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates reflected in IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns as low-intensity bands. *J Clin Microbiol* **38**:4478-84.
 67. **de Kantor, I. N., and V. Ritacco.** 2009. [Is the tuberculin skin test still suitable to diagnose tuberculosis infection?]. *Medicina (B Aires)* **69**:359-69.
 68. **de Vries, G., H. W. Baars, M. M. Sebek, N. A. van Hest, and J. H. Richardus.** 2008. Transmission classification model to determine place and time of infection of tuberculosis cases in an urban area. *J Clin Microbiol* **46**:3924-30.
 69. **Dennis, G., Jr., B. T. Sherman, D. A. Hosack, J. Yang, W. Gao, H. C. Lane, and R. A. Lempicki.** 2003. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* **4**:P3.
 70. **Diaz, R., K. Kremer, P. E. de Haas, R. I. Gomez, A. Marrero, J. A. Valdivia, J. D. van Embden, and D. van Soolingen.** 1998. Molecular epidemiology of tuberculosis in Cuba outside of Havana, July 1994-June 1995: utility of spoligotyping versus IS6110 restriction fragment length polymorphism. *Int J Tuberc Lung Dis* **2**:743-50.
 71. **Diel, R., S. Rusch-Gerdes, and S. Niemann.** 2004. Molecular epidemiology of tuberculosis among immigrants in Hamburg, Germany. *J Clin Microbiol* **42**:2952-60.
 72. **Dillaha, J. A., Z. Yang, K. Ijaz, K. D. Eisenach, M. D. Cave, F. J. Wilson, W. W. Stead, and J. H. Bates.** 2002. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in a rural community, Arkansas, 1945-2000. *Emerg Infect Dis* **8**:1246-8.
 73. **Domínguez-Castellano, A., del Arco, A., Canueto-Quintero, J., Rivero-Román, A., Kindelán, J.M., and R. C. y. F. Díez-García.** 2007. Guía de práctica clínica de la Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas (SAEI) sobre el tratamiento de la tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **25**:519-34.
 74. **Dormans, J., M. Burger, D. Aguilar, R. Hernandez-Pando, K. Kremer, P. Roholl, S. M. Arend, and D. van Soolingen.** 2004. Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in a BALB/c mouse model. *Clin Exp Immunol* **137**:460-8.
 75. **Douglas, J. T., L. Qian, J. C. Montoya, J. M. Musser, J. D. Van Embden, D. Van Soolingen, and K. Kremer.** 2003. Characterization of the Manila family of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **41**:2723-6.
 76. **Douvas, G. S., D. L. Looker, A. E. Vatter, and A. J. Crowle.** 1985. Gamma interferon activates human macrophages to become tumoricidal and

- leishmanicidal but enhances replication of macrophage-associated mycobacteria. *Infect Immun* **50**:1-8.
77. **du Plessis, D. G., R. Warren, M. Richardson, J. J. Joubert, and P. D. van Helden.** 2001. Demonstration of reinfection and reactivation in HIV-negative autopsied cases of secondary tuberculosis: multilesional genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* utilizing IS 6110 and other repetitive element-based DNA fingerprinting. *Tuberculosis (Edinb)* **81**:211-20.
78. **Dye, C., D. Maher, D. Weil, M. Espinal, and M. Raviglione.** 2006. Targets for global tuberculosis control. *Int J Tuberc Lung Dis* **10**:460-2.
79. **Ehrt, S., D. Schnappinger, S. Bekiranov, J. Drenkow, S. Shi, T. R. Gingeras, T. Gaasterland, G. Schoolnik, and C. Nathan.** 2001. Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and *Mycobacterium tuberculosis*: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. *J Exp Med* **194**:1123-40.
80. **Eker, B., J. Ortmann, G. B. Migliori, G. Sotgiu, R. Muetterlein, R. Centis, H. Hoffmann, D. Kirsten, T. Schaberg, S. Ruesch-Gerdes, and C. Lange.** 2008. Multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis, Germany. *Emerg Infect Dis* **14**:1700-6.
81. **Filliol, I., J. R. Driscoll, D. van Soolingen, B. N. Kreiswirth, K. Kremer, G. Valetudie, D. A. Dang, R. Barlow, D. Banerjee, P. J. Bifani, K. Brudey, A. Cataldi, R. C. Cooksey, D. V. Cousins, J. W. Dale, O. A. Dellagostin, F. Drobniowski, G. Engelmann, S. Ferdinand, D. Gascoyne-Binzi, M. Gordon, M. C. Gutierrez, W. H. Haas, H. Heersma, E. Kassa-Kelembho, M. L. Ho, A. Makristathis, C. Mammina, G. Martin, P. Mostrom, I. Mokrousov, V. Narbonne, O. Narvskaya, A. Nastasi, S. N. Niobe-Eyangoh, J. W. Pape, V. Rasoloflo-Razanamparany, M. Ridell, M. L. Rossetti, F. Stauffer, P. N. Suffys, H. Takiff, J. Texier-Maugein, V. Vincent, J. H. de Waard, C. Sola, and N. Rastogi.** 2003. Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study. *J Clin Microbiol* **41**:1963-70.
82. **Filliol, I., A. S. Motiwala, M. Cavatore, W. Qi, M. H. Hazbon, M. Bobadilla del Valle, J. Fyfe, L. Garcia-Garcia, N. Rastogi, C. Sola, T. Zozio, M. I. Guerrero, C. I. Leon, J. Crabtree, S. Angiuoli, K. D. Eisenach, R. Durmaz, M. L. Joloba, A. Rendon, J. Sifuentes-Osornio, A. Ponce de Leon, M. D. Cave, R. Fleischmann, T. S. Whittam, and D. Alland.** 2006. Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *J Bacteriol* **188**:759-72.
83. **Fisher, M. A., B. B. Plikaytis, and T. M. Shinnick.** 2002. Microarray analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional response to the acidic conditions found in phagosomes. *J Bacteriol* **184**:4025-32.
84. **Fitzpatrick, L. K., A. Okwera, R. Mugerwa, R. Ridzon, J. Ehiner, and I. Onorato.** 2002. An investigation of suspected exogenous reinfection in tuberculosis patients in Kampala, Uganda. *Int J Tuberc Lung Dis* **6**:550-2.
85. **Fleischmann, R. D., D. Alland, J. A. Eisen, L. Carpenter, O. White, J. Peterson, R. DeBoy, R. Dodson, M. Gwinn, D. Haft, E. Hickey, J. F. Kolonay, W. C. Nelson, L. A. Umayam, M. Ermolaeva, S. L. Salzberg, A. Delcher, T. Utterback, J. Weidman, H. Khouri, J. Gill, A. Mikula, W. Bishai, W. R.**

- Jacobs Jr, Jr., J. C. Venter, and C. M. Fraser. 2002. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol* **184**:5479-90.
86. Flynn, J. L. 1999. Why is IFN-gamma insufficient to control tuberculosis? *Trends Microbiol* **7**:477-8; author reply 478-9.
87. Flynn, J. L., and J. Chan. 2001. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* **19**:93-129.
88. Flynn, J. L., J. Chan, K. J. Triebold, D. K. Dalton, T. A. Stewart, and B. R. Bloom. 1993. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* **178**:2249-54.
89. Flynn, J. L., and J. D. Ernst. 2000. Immune responses in tuberculosis. *Curr Opin Immunol* **12**:432-6.
90. Flynn, J. L., M. M. Goldstein, J. Chan, K. J. Triebold, K. Pfeffer, C. J. Lowenstein, R. Schreiber, T. W. Mak, and B. R. Bloom. 1995. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* **2**:561-72.
91. Flynn, J. L., C. A. Scanga, K. E. Tanaka, and J. Chan. 1998. Effects of aminoguanidine on latent murine tuberculosis. *J Immunol* **160**:1796-803.
92. Fontan, P., V. Aris, S. Ghanny, P. Soteropoulos, and I. Smith. 2008. Global transcriptional profile of *Mycobacterium tuberculosis* during THP-1 human macrophage infection. *Infect Immun* **76**:717-25.
93. Gagneux, S., K. DeRiemer, T. Van, M. Kato-Maeda, B. C. de Jong, S. Narayanan, M. Nicol, S. Niemann, K. Kremer, M. C. Gutierrez, M. Hilty, P. C. Hopewell, and P. M. Small. 2006. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:2869-73.
94. Garcia de Viedma, D., N. Alonso Rodriguez, S. Andres, M. Martinez Lirola, M. J. Ruiz Serrano, and E. Bouza. 2006. Evaluation of alternatives to RFLP for the analysis of clustered cases of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* **10**:454-9.
95. Garcia de Viedma, D., N. Alonso Rodriguez, S. Andres, M. J. Ruiz Serrano, and E. Bouza. 2005. Characterization of clonal complexity in tuberculosis by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing. *J Clin Microbiol* **43**:5660-4.
96. García de Viedma, D., Chaves, F., Íñigo, J. . 2004. Tuberculosis en inmigrantes: ¿es importada? *Enf Emerg.* **6**:248-9.
97. Garcia de Viedma, D., M. Marin, S. Andres, G. Lorenzo, M. J. Ruiz-Serrano, and E. Bouza. 2006. Complex clonal features in an mycobacterium tuberculosis infection in a two-year-old child. *Pediatr Infect Dis J* **25**:457-9.
98. Garcia de Viedma, D., M. Marin, S. Hernangomez, M. Diaz, M. J. Ruiz Serrano, L. Alcala, and E. Bouza. 2002. Tuberculosis recurrences: reinfection plays a role in a population whose clinical/epidemiological characteristics do not favor reinfection. *Arch Intern Med* **162**:1873-9.
99. Garcia de Viedma, D., M. Marin, M. J. Ruiz Serrano, L. Alcala, and E. Bouza. 2003. Polyclonal and compartmentalized infection by *Mycobacterium tuberculosis* in patients with both respiratory and extrapulmonary involvement. *J Infect Dis* **187**:695-9.
100. Gibney, K. B., S. Mahrshahi, J. Torresi, C. Marshall, K. Leder, and B. A. Biggs. 2009. The profile of health problems in African immigrants attending an infectious disease unit in Melbourne, Australia. *Am J Trop Med Hyg* **80**:805-11.

101. **Gibson, A. L., R. C. Huard, N. C. Gey van Pittius, L. C. Lazzarini, J. Driscoll, N. Kurepina, T. Zozio, C. Sola, S. M. Spindola, A. L. Kritski, D. Fitzgerald, K. Kremer, H. Mardassi, P. Chitale, J. Brinkworth, D. Garcia de Viedma, B. Gicquel, J. W. Pape, D. van Soolingen, B. N. Kreiswirth, R. M. Warren, P. D. van Helden, N. Rastogi, P. N. Suffys, J. Lapa e Silva, and J. L. Ho.** 2008. Application of sensitive and specific molecular methods to uncover global dissemination of the major RDRio Sublineage of the Latin American-Mediterranean *Mycobacterium tuberculosis* spoligotype family. *J Clin Microbiol* **46**:1259-67.
102. **Glynn, J. R., J. Whiteley, P. J. Bifani, K. Kremer, and D. van Soolingen.** 2002. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis* **8**:843-9.
103. **Glynn, J. R., M. D. Yates, A. C. Crampin, B. M. Ngwira, F. D. Mwaungulu, G. F. Black, S. D. Chaguluka, D. T. Mwafulirwa, S. Floyd, C. Murphy, F. A. Drobniowski, and P. E. Fine.** 2004. DNA fingerprint changes in tuberculosis: reinfection, evolution, or laboratory error? *J Infect Dis* **190**:1158-66.
104. **Goren, M. B., Brennan, P.J.** 1979. Mycobacterial Lipids: Chemistry and Biological Activities. In GP Youmans (Ed), *Tuberculosis*. Philadelphia: Saunders:69-193.
105. **Gupta, R., J. P. Cegielski, M. A. Espinal, M. Henkens, J. Y. Kim, C. S. Lambregts-Van Weezenbeek, J. W. Lee, M. C. Raviglione, P. G. Suarez, and F. Varaine.** 2002. Increasing transparency in partnerships for health--introducing the Green Light Committee. *Trop Med Int Health* **7**:970-6.
106. **Gutacker, M. M., J. C. Smoot, C. A. Migliaccio, S. M. Ricklefs, S. Hua, D. V. Cousins, E. A. Graviss, E. Shashkina, B. N. Kreiswirth, and J. M. Musser.** 2002. Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. *Genetics* **162**:1533-43.
107. **Heersma, H. F., K. Kremer, and J. D. van Embden.** 1998. Computer analysis of IS6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Mol Biol* **101**:395-422.
108. **Hermans, P. W., F. Messadi, H. Guebrexabher, D. van Soolingen, P. E. de Haas, H. Heersma, H. de Neeling, A. Ayoub, F. Portaels, D. Frommel, and et al.** 1995. Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia, and The Netherlands: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. *J Infect Dis* **171**:1504-13.
109. **Hernandez-Pando, R., H. Orozco, and D. Aguilar.** 2009. Factors that deregulate the protective immune response in tuberculosis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **57**:355-67.
110. **Hernandez-Pando, R., H. Orozco, A. Sampieri, L. Pavon, C. Velasquillo, J. Larriva-Sahd, J. M. Alcocer, and M. V. Madrid.** 1996. Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* **89**:26-33.
111. **Hollo, V., A. Amato-Gauci, C. Kodmon, and D. Manissero.** 2009. Tuberculosis in the EU and EEA/EFTA countries: what is the latest data telling us? *Euro Surveill* **14**.
112. **Hong, F., R. Breitling, C. W. McEntee, B. S. Wittner, J. L. Nemhauser, and J. Chory.** 2006. RankProd: a bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis. *Bioinformatics* **22**:2825-7.

113. **Houben, E. N., L. Nguyen, and J. Pieters.** 2006. Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system. *Curr Opin Microbiol* **9**:76-85.
114. **Houghton, A. M., W. O. Hartzell, C. S. Robbins, F. X. Gomis-Ruth, and S. D. Shapiro.** 2009. Macrophage elastase kills bacteria within murine macrophages. *Nature* **460**:637-41.
115. **Huard, R. C., M. Fabre, P. de Haas, L. C. Lazzarini, D. van Soolingen, D. Cousins, and J. L. Ho.** 2006. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Bacteriol* **188**:4271-87.
116. **Huebner, R. E., and K. G. Castro.** 1995. The changing face of tuberculosis. *Annu Rev Med* **46**:47-55.
117. **Inigo, J., A. Arce, E. Rodriguez, D. Garcia de Viedma, E. Palenque, M. J. Ruiz Serrano, L. Cabello, and F. Chaves.** 2006. Tuberculosis trends in Madrid, 1994-2003: impact of immigration and HIV infection. *Int J Tuberc Lung Dis* **10**:550-3.
118. **Inigo, J., D. Garcia de Viedma, A. Arce, E. Palenque, N. Alonso Rodriguez, E. Rodriguez, M. J. Ruiz Serrano, S. Andres, E. Bouza, and F. Chaves.** 2007. Analysis of changes in recent tuberculosis transmission patterns after a sharp increase in immigration. *J Clin Microbiol* **45**:63-9.
119. **Kallenius, G., T. Koivula, S. Ghebremichael, S. E. Hoffner, R. Norberg, E. Svensson, F. Dias, B. I. Marklund, and S. B. Svenson.** 1999. Evolution and clonal traits of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Guinea-Bissau. *J Clin Microbiol* **37**:3872-8.
120. **Kam, K. M., C. W. Yip, L. W. Tse, K. L. Wong, T. K. Lam, K. Kremer, B. K. Au, and D. van Soolingen.** 2005. Utility of mycobacterial interspersed repetitive unit typing for differentiating multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates of the Beijing family. *J Clin Microbiol* **43**:306-13.
121. **Kamerbeek, J., L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, and J. van Embden.** 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* **35**:907-14.
122. **Kaplan, G., F. A. Post, A. L. Moreira, H. Wainwright, B. N. Kreiswirth, M. Tanverdi, B. Mathema, S. V. Ramaswamy, G. Walther, L. M. Steyn, C. E. Barry, 3rd, and L. G. Bekker.** 2003. *Mycobacterium tuberculosis* growth at the cavity surface: a microenvironment with failed immunity. *Infect Immun* **71**:7099-108.
123. **Kiers, A., A. P. Drost, D. van Soolingen, and J. Veen.** 1997. Use of DNA fingerprinting in international source case finding during a large outbreak of tuberculosis in The Netherlands. *Int J Tuberc Lung Dis* **1**:239-45.
124. **Kisich, K. O., L. Heifets, M. Higgins, and G. Diamond.** 2001. Antimycobacterial agent based on mRNA encoding human beta-defensin 2 enables primary macrophages to restrict growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **69**:2692-9.
125. **Kong, P. M., J. Tapy, P. Calixto, W. J. Burman, R. R. Reves, Z. Yang, and M. D. Cave.** 2002. Skin-test screening and tuberculosis transmission among the homeless. *Emerg Infect Dis* **8**:1280-4.
126. **Kremer, K., C. Arnold, A. Cataldi, M. C. Gutierrez, W. H. Haas, S. Panaiotov, R. A. Skuce, P. Supply, A. G. van der Zanden, and D. van**

- Soolingen. 2005. Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microbiol* **43**:5628-38.
127. Kremer, K., D. van Soolingen, R. Frothingham, W. H. Haas, P. W. Hermans, C. Martin, P. Palittapongarnpim, B. B. Plikaytis, L. W. Riley, M. A. Yakrus, J. M. Musser, and J. D. van Embden. 1999. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* **37**:2607-18.
128. Kruuner, A., S. E. Hoffner, H. Sillastu, M. Danilovits, K. Levina, S. B. Svenson, S. Ghebremichael, T. Koivula, and G. Kallenius. 2001. Spread of drug-resistant pulmonary tuberculosis in Estonia. *J Clin Microbiol* **39**:3339-45.
129. Kwara, A., R. Schiro, L. S. Cowan, N. E. Hyslop, M. F. Wiser, S. Roahen Harrison, P. Kissinger, L. Diem, and J. T. Crawford. 2003. Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* **41**:2683-5.
130. Li, Q., C. C. Whalen, J. M. Albert, R. Larkin, L. Zukowski, M. D. Cave, and R. F. Silver. 2002. Differences in rate and variability of intracellular growth of a panel of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates within a human monocyte model. *Infect Immun* **70**:6489-93.
131. Lillebaek, T., A. Dirksen, A. Kok-Jensen, and A. B. Andersen. 2004. A dominant *Mycobacterium tuberculosis* strain emerging in Denmark. *Int J Tuberc Lung Dis* **8**:1001-6.
132. Liu, Y., M. S. Weinberg, L. S. Ortega, J. A. Painter, and S. A. Maloney. 2009. Overseas screening for tuberculosis in U.S.-bound immigrants and refugees. *N Engl J Med* **360**:2406-15.
133. Lopez-Calleja, A. I., P. Gavin, M. A. Lezcano, M. A. Vitoria, M. J. Iglesias, J. Guimbao, M. A. Lazaro, N. Rastogi, M. J. Revillo, C. Martin, and S. Samper. 2009. Unsuspected and extensive transmission of a drug-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strain. *BMC Pulm Med* **9**:3.
134. Macaraig, M., T. Agerton, C. R. Driver, S. S. Munsiff, J. Abdelwahab, J. Park, B. Kreiswirth, J. Driscoll, and B. Zhao. 2006. Strain-specific differences in two large *Mycobacterium tuberculosis* genotype clusters in isolates collected from homeless patients in New York City from 2001 to 2004. *J Clin Microbiol* **44**:2890-6.
135. Manca, C., M. B. Reed, S. Freeman, B. Mathema, B. Kreiswirth, C. E. Barry, 3rd, and G. Kaplan. 2004. Differential monocyte activation underlies strain-specific *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Infect Immun* **72**:5511-4.
136. Manca, C., L. Tsenova, C. E. Barry, 3rd, A. Bergtold, S. Freeman, P. A. Haslett, J. M. Musser, V. H. Freedman, and G. Kaplan. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 induces a more vigorous host response in vivo and in vitro, but is not more virulent than other clinical isolates. *J Immunol* **162**:6740-6.
137. Manca, C., L. Tsenova, A. Bergtold, S. Freeman, M. Tovey, J. M. Musser, C. E. Barry, 3rd, V. H. Freedman, and G. Kaplan. 2001. Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha /beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:5752-7.
138. Manca, C., L. Tsenova, S. Freeman, A. K. Barczak, M. Tovey, P. J. Murray, C. Barry, and G. Kaplan. 2005. Hypervirulent M. tuberculosis W/Beijing

- strains upregulate type I IFNs and increase expression of negative regulators of the Jak-Stat pathway. *J Interferon Cytokine Res* **25**:694-701.
139. **Marri, P. R., J. P. Bannantine, and G. B. Golding.** 2006. Comparative genomics of metabolic pathways in *Mycobacterium* species: gene duplication, gene decay and lateral gene transfer. *FEMS Microbiol Rev* **30**:906-25.
 140. **Martin, C., A. Williams, R. Hernandez-Pando, P. J. Cardona, E. Gormley, Y. Bordat, C. Y. Soto, S. O. Clark, G. J. Hatch, D. Aguilar, V. Ausina, and B. Gicquel.** 2006. The live *Mycobacterium tuberculosis* *phoP* mutant strain is more attenuated than BCG and confers protective immunity against tuberculosis in mice and guinea pigs. *Vaccine* **24**:3408-19.
 141. **Martinez-Lirola, M., N. Alonso-Rodriguez, M. L. Sanchez, M. Herranz, S. Andres, T. Penafiel, M. C. Rogado, T. Cabezas, J. Martinez, M. A. Lucerna, M. Rodriguez, C. Bonillo Mdel, E. Bouza, and D. Garcia de Viedma.** 2008. Advanced survey of tuberculosis transmission in a complex socioepidemiologic scenario with a high proportion of cases in immigrants. *Clin Infect Dis* **47**:8-14.
 142. **Martinez, M., D. Garcia de Viedma, M. Alonso, S. Andres, E. Bouza, T. Cabezas, I. Cabeza, A. Reyes, W. Sanchez-Yebra, M. Rodriguez, M. I. Sanchez, M. C. Rogado, R. Fernandez, T. Penafiel, J. Martinez, P. Barroso, M. A. Lucerna, L. F. Diez, and C. Gutierrez.** 2006. Impact of laboratory cross-contamination on molecular epidemiology studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol* **44**:2967-9.
 143. **Master, S. S., S. K. Rampini, A. S. Davis, C. Keller, S. Ehlers, B. Springer, G. S. Timmins, P. Sander, and V. Deretic.** 2008. *Mycobacterium tuberculosis* prevents inflammasome activation. *Cell Host Microbe* **3**:224-32.
 144. **Mathema, B., N. E. Kurepina, P. J. Bifani, and B. N. Kreiswirth.** 2006. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clin Microbiol Rev* **19**:658-85.
 145. **McCray, E., C. M. Weinbaum, C. R. Braden, and I. M. Onorato.** 1997. The epidemiology of tuberculosis in the United States. *Clin Chest Med* **18**:99-113.
 146. **McElroy, P. D., T. R. Sterling, C. R. Driver, B. Kreiswirth, C. L. Woodley, W. A. Cronin, D. X. Hardge, K. L. Shilkret, and R. Ridzon.** 2002. Use of DNA fingerprinting to investigate a multiyear, multistate tuberculosis outbreak. *Emerg Infect Dis* **8**:1252-6.
 147. **Menzies, D.** 1999. Interpretation of repeated tuberculin tests. Boosting, conversion, and reversion. *Am J Respir Crit Care Med* **159**:15-21.
 148. **Middelkoop, K., L. G. Bekker, B. Mathema, E. Shashkina, N. Kurepina, A. Whitelaw, D. Fallows, C. Morrow, B. Kreiswirth, G. Kaplan, and R. Wood.** 2009. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in a South African community with high HIV prevalence. *J Infect Dis* **200**:1207-11.
 149. **Migliori, G. B., and R. Centis.** 2002. Problems to control tuberculosis in eastern Europe and consequences in low incidence countries. *Monaldi Arch Chest Dis* **57**:285-90.
 150. **Mitchison, D. A.** 2000. Role of individual drugs in the chemotherapy of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* **4**:796-806.
 151. **Mogensen, T. H., S. R. Paludan, M. Kilian, and L. Ostergaard.** 2006. Two neisseria meningitidis strains with different ability to stimulate toll-like receptor 4 through the MyD88-independent pathway. *Scand J Immunol* **64**:646-54.
 152. **Mokrousov, I., O. Narvskaya, E. Limeschenko, A. Vyazovaya, T. Otten, and B. Vyshnevskiy.** 2004. Analysis of the allelic diversity of the mycobacterial

- interspersed repetitive units in *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing family: practical implications and evolutionary considerations. *J Clin Microbiol* **42**:2438-44.
153. **Moro, M. L., A. Gori, I. Errante, A. Infuso, F. Franzetti, L. Sodano, and E. Iemoli.** 1998. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis involving HIV-infected patients of two hospitals in Milan, Italy. Italian Multidrug-Resistant Tuberculosis Outbreak Study Group. *Aids* **12**:1095-102.
 154. **Moss, A. R., D. Alland, E. Telzak, D. Hewlett, Jr., V. Sharp, P. Chiliade, V. LaBombardi, D. Kabus, B. Hanna, L. Palumbo, K. Brudney, A. Weltman, K. Stoeckle, K. Chirgwin, M. Simberkoff, S. Moghazeh, W. Eisner, M. Lutfey, and B. Kreiswirth.** 1997. A city-wide outbreak of a multiple-drug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis* in New York. *Int J Tuberc Lung Dis* **1**:115-21.
 155. **Munsiff, S. S., T. Bassoff, B. Nivin, J. Li, A. Sharma, P. Bifani, B. Mathema, J. Driscoll, and B. N. Kreiswirth.** 2002. Molecular epidemiology of multidrug-resistant tuberculosis, New York City, 1995-1997. *Emerg Infect Dis* **8**:1230-8.
 156. **Murray, M., and E. Nardell.** 2002. Molecular epidemiology of tuberculosis: achievements and challenges to current knowledge. *Bull World Health Organ* **80**:477-82.
 157. **Murray P.R., B. E. J., Jorgensen J. , Pfaller M.A., Landry M.L.** 2007. *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Edition. American Society for Microbiology.
 158. **Nakamura, Y., Y. Obase, N. Suyama, Y. Miyazaki, H. Ohno, M. Oka, M. Takahashi, and S. Kohno.** 2004. A small outbreak of pulmonary tuberculosis in non-close contact patrons of a bar. *Intern Med* **43**:263-7.
 159. **Nau, G. J., J. F. Richmond, A. Schlesinger, E. G. Jennings, E. S. Lander, and R. A. Young.** 2002. Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:1503-8.
 160. **Newton, S. M., R. J. Smith, K. A. Wilkinson, M. P. Nicol, N. J. Garton, K. J. Staples, G. R. Stewart, J. R. Wain, A. R. Martineau, S. Fandrich, T. Smallie, B. Foxwell, A. Al-Obaidi, J. Shafi, K. Rajakumar, B. Kampmann, P. W. Andrew, L. Ziegler-Heitbrock, M. R. Barer, and R. J. Wilkinson.** 2006. A deletion defining a common Asian lineage of *Mycobacterium tuberculosis* associates with immune subversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:15594-8.
 161. **Neyrolles, O., R. Hernandez-Pando, F. Pietri-Rouxel, P. Fornes, L. Tailleux, J. A. Barrios Payan, E. Pivert, Y. Bordat, D. Aguilar, M. C. Prevost, C. Petit, and B. Gicquel.** 2006. Is adipose tissue a place for *Mycobacterium tuberculosis* persistence? *PLoS One* **1**:e43.
 162. **Oelemann, M. C., R. Diel, V. Vatin, W. Haas, S. Rusch-Gerdes, C. Locht, S. Niemann, and P. Supply.** 2007. Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive- unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol* **45**:691-7.
 163. **Onyebujoh, P., A. Zumla, I. Ribeiro, R. Rustomjee, P. Mwaba, M. Gomes, and J. M. Grange.** 2005. Treatment of tuberculosis: present status and future prospects. *Bull World Health Organ* **83**:857-65.
 164. **Ordobás Gavín, M., Cañellas Llabrés, S., Garcia Fernández, C., García Comas, L., Gutiérrez Rodríguez, M.A., Rodero Garduño, I., García, and J. Gutierrez, Ramirez Fernández, R., Rodríguez Artalejo, F.** 2007. Tuberculosis

- en la Comunidad de Madrid. Incidencia en personas extranjeras y españolas durante el período 1996-2004. *Rev Esp Salud Pública* **81**:597-604.
165. **Pai, M., S. Kalantri, and K. Dheda.** 2006. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: part II. Active tuberculosis and drug resistance. *Expert Rev Mol Diagn* **6**:423-32.
 166. **Palomino, J. C., Leao, S. C., Ritacco, V.** 2007. Tuberculosis 2007. From Basic Science to Patient Care.
 167. **Park, H. D., K. M. Guinn, M. I. Harrell, R. Liao, M. I. Voskuil, M. Tompa, G. K. Schoolnik, and D. R. Sherman.** 2003. Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **48**:833-43.
 168. **Parrish, N. M., J. D. Dick, and W. R. Bishai.** 1998. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* **6**:107-12.
 169. **Pena, M. J., J. A. Caminero, M. I. Campos-Herrero, J. C. Rodriguez-Gallego, M. I. Garcia-Laorden, P. Cabrera, M. J. Torres, B. Lafarga, F. Rodriguez de Castro, S. Samper, F. Canas, D. A. Enarson, and C. Martin.** 2003. Epidemiology of tuberculosis on Gran Canaria: a 4 year population study using traditional and molecular approaches. *Thorax* **58**:618-22.
 170. **Petrelli, D., M. Kaushal Sharma, J. Wolfe, A. Al-Azem, E. Hershfield, and A. Kabani.** 2004. Strain-related virulence of the dominant *Mycobacterium tuberculosis* strain in the Canadian province of Manitoba. *Tuberculosis (Edinb)* **84**:317-26.
 171. **Pieters, J.** 2001. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes Infect* **3**:249-55.
 172. **Portaels, F., L. Rigouts, and I. Bastian.** 1999. Addressing multidrug-resistant tuberculosis in penitentiary hospitals and in the general population of the former Soviet Union. *Int J Tuberc Lung Dis* **3**:582-8.
 173. **Ragno, S., M. Romano, S. Howell, D. J. Pappin, P. J. Jenner, and M. J. Colston.** 2001. Changes in gene expression in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*: a combined transcriptomic and proteomic approach. *Immunology* **104**:99-108.
 174. **Rajakumar, K., J. Shafi, R. J. Smith, R. A. Stabler, P. W. Andrew, D. Modha, G. Bryant, P. Monk, J. Hinds, P. D. Butcher, and M. R. Barer.** 2004. Use of genome level-informed PCR as a new investigational approach for analysis of outbreak-associated *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* **42**:1890-6.
 175. **Rand, L., J. A. Green, L. Saraiva, J. S. Friedland, and P. T. Elkington.** 2009. Matrix metalloproteinase-1 is regulated in tuberculosis by a p38 MAPK-dependent, p-aminosalicylic acid-sensitive signaling cascade. *J Immunol* **182**:5865-72.
 176. **Reed, M. B., P. Domenech, C. Manca, H. Su, A. K. Barczak, B. N. Kreiswirth, G. Kaplan, and C. E. Barry, 3rd.** 2004. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature* **431**:84-7.
 177. **Reichler, M. R., R. Reves, S. Bur, V. Thompson, B. T. Mangura, J. Ford, S. E. Valway, and I. M. Onorato.** 2002. Evaluation of investigations conducted to detect and prevent transmission of tuberculosis. *Jama* **287**:991-5.

178. **Rengarajan, J., B. R. Bloom, and E. J. Rubin.** 2005. Genome-wide requirements for *Mycobacterium tuberculosis* adaptation and survival in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:8327-32.
179. **Richardson, M., N. M. Carroll, E. Engelke, G. D. Van Der Spuy, F. Salker, Z. Munch, R. P. Gie, R. M. Warren, N. Beyers, and P. D. Van Helden.** 2002. Multiple *Mycobacterium tuberculosis* strains in early cultures from patients in a high-incidence community setting. *J Clin Microbiol* **40**:2750-4.
180. **Rieder, H. L., J. P. Zellweger, M. C. Raviglione, S. T. Keizer, and G. B. Migliori.** 1994. Tuberculosis control in Europe and international migration. *Eur Respir J* **7**:1545-53.
181. **Rinder, H., K. T. Mieskes, and T. Loscher.** 2001. Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* **5**:339-45.
182. **Ritacco, V., M. Di Lonardo, A. Reniero, M. Ambroggi, L. Barrera, A. Dambrosi, B. Lopez, N. Isola, and I. N. de Kantor.** 1997. Nosocomial spread of human immunodeficiency virus-related multidrug-resistant tuberculosis in Buenos Aires. *J Infect Dis* **176**:637-42.
183. **Rom, W. N., Garay, S.M.** 1996. Tuberculosis, 1st Edition. Chapter 13, p. 171-185.
184. **Rook, G. A., J. Steele, M. Ainsworth, and B. R. Champion.** 1986. Activation of macrophages to inhibit proliferation of *Mycobacterium tuberculosis*: comparison of the effects of recombinant gamma-interferon on human monocytes and murine peritoneal macrophages. *Immunology* **59**:333-8.
185. **Ruiz Serrano, M. J., Alcalá Hernández, L., García de Viedma, D., Marín Arriaza, M.** 2003. Nuevas herramientas de laboratorio aplicadas al diagnóstico de la tuberculosis, p. 223-270, *Infección* 2003. Emilio Bouza, Juan J. Picazo.
186. **Saunders, B. M., and A. M. Cooper.** 2000. Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol Cell Biol* **78**:334-41.
187. **Savine, E., R. M. Warren, G. D. van der Spuy, N. Beyers, P. D. van Helden, C. Locht, and P. Supply.** 2002. Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **40**:4561-6.
188. **Schnappinger, D., S. Ehrt, M. I. Voskuil, Y. Liu, J. A. Mangan, I. M. Monahan, G. Dolganov, B. Efron, P. D. Butcher, C. Nathan, and G. K. Schoolnik.** 2003. Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. *J Exp Med* **198**:693-704.
189. **Sebban, M., I. Mokrousov, N. Rastogi, and C. Sola.** 2002. A data-mining approach to spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioinformatics* **18**:235-43.
190. **Shamputa, I. C., L. Jugheli, N. Sadradze, E. Willery, F. Portaels, P. Supply, and L. Rigouts.** 2006. Mixed infection and clonal representativeness of a single sputum sample in tuberculosis patients from a penitentiary hospital in Georgia. *Respir Res* **7**:99.
191. **Shamputa, I. C., L. Rigouts, L. A. Eyongeta, N. A. El Aila, A. van Deun, A. H. Salim, E. Willery, C. Locht, P. Supply, and F. Portaels.** 2004. Genotypic and phenotypic heterogeneity among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from pulmonary tuberculosis patients. *J Clin Microbiol* **42**:5528-36.
192. **Sharma, M. K., A. Al-Azem, J. Wolfe, E. Hershfield, and A. Kabani.** 2003. Identification of a predominant isolate of *Mycobacterium tuberculosis* using

- molecular and clinical epidemiology tools and in vitro cytokine responses. *BMC Infect Dis* 3:3.
193. **Sharma, S. K., and J. J. Liu.** 2006. Progress of DOTS in global tuberculosis control. *Lancet* 367:951-2.
 194. **Sharnprapai, S., A. C. Miller, R. Suruki, E. Corkren, S. Etkind, J. Driscoll, M. McGarry, and E. Nardell.** 2002. Genotyping analyses of tuberculosis cases in U.S.- and foreign-born Massachusetts residents. *Emerg Infect Dis* 8:1239-45.
 195. **Sherman, D. R., M. Voskuil, D. Schnappinger, R. Liao, M. I. Harrell, and G. K. Schoolnik.** 2001. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding alpha -crystallin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7534-9.
 196. **Shi, S., A. Blumenthal, C. M. Hickey, S. Gandotra, D. Levy, and S. Ehrt.** 2005. Expression of many immunologically important genes in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages is independent of both TLR2 and TLR4 but dependent on IFN- α receptor and STAT1. *J Immunol* 175:3318-28.
 197. **Shimizu, Y., K. Dobashi, Y. Yoshikawa, S. Yabe, S. Higuchi, Y. Koike, Y. Mita, M. Utsugi, K. Endou, K. Takahashi, S. Watanabe, R. Saito, and M. Mori.** 2008. Five-antituberculosis Drug-resistance Genes Detection Using Array System. *J Clin Biochem Nutr* 42:228-34.
 198. **Siddiqi, S. H., J. E. Hawkins, and A. Laszlo.** 1985. Interlaboratory drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a radiometric procedure and two conventional methods. *J Clin Microbiol* 22:919-23.
 199. **Sinsimer, D., G. Huet, C. Manca, L. Tsenova, M. S. Koo, N. Kurepina, B. Kana, B. Mathema, S. A. Marras, B. N. Kreiswirth, C. Guilhot, and G. Kaplan.** 2008. The phenolic glycolipid of *Mycobacterium tuberculosis* differentially modulates the early host cytokine response but does not in itself confer hypervirulence. *Infect Immun* 76:3027-36.
 200. **Sintchenko, V., and G. L. Gilbert.** 2007. Utility of genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* in the contact investigation: a decision analysis. *Tuberculosis (Edinb)* 87:176-84.
 201. **Small, P. M., P. C. Hopewell, S. P. Singh, A. Paz, J. Parsonnet, D. C. Ruston, G. F. Schecter, C. L. Daley, and G. K. Schoolnik.** 1994. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med* 330:1703-9.
 202. **Small, P. M., N. B. McClenny, S. P. Singh, G. K. Schoolnik, L. S. Tompkins, and P. A. Mickelsen.** 1993. Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis* to confirm cross-contamination in the mycobacteriology laboratory and modification of procedures to minimize occurrence of false-positive cultures. *J Clin Microbiol* 31:1677-82.
 203. **Smith, I.** 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* 16:463-96.
 204. **Sonnenberg, P., J. Murray, J. R. Glynn, S. Shearer, B. Kambashi, and P. Godfrey-Faussett.** 2001. HIV-1 and recurrence, relapse, and reinfection of tuberculosis after cure: a cohort study in South African mineworkers. *Lancet* 358:1687-93.
 205. **Sreevatsan, S., X. Pan, K. E. Stockbauer, N. D. Connell, B. N. Kreiswirth, T. S. Whittam, and J. M. Musser.** 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9869-74.

206. **Stead, W. W.** 1967. Pathogenesis of a first episode of chronic pulmonary tuberculosis in man: recrudescence of residuals of the primary infection or exogenous reinfection? *Am Rev Respir Dis* **95**:729-45.
207. **Stewart, G. R., L. Wernisch, R. Stabler, J. A. Mangan, J. Hinds, K. G. Laing, D. B. Young, and P. D. Butcher.** 2002. Dissection of the heat-shock response in *Mycobacterium tuberculosis* using mutants and microarrays. *Microbiology* **148**:3129-38.
208. **Stokes, R. W., and D. Doxsee.** 1999. The receptor-mediated uptake, survival, replication, and drug sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* within the macrophage-like cell line THP-1: a comparison with human monocyte-derived macrophages. *Cell Immunol* **197**:1-9.
209. **Suffys, P. N., M. E. Ivens de Araujo, M. L. Rossetti, A. Zahab, E. W. Barroso, A. M. Barreto, E. Campos, D. van Soolingen, K. Kremer, H. Heersma, and W. M. Degraeve.** 2000. Usefulness of IS6110-restriction fragment length polymorphism typing of Brazilian strains of *Mycobacterium tuberculosis* and comparison with an international fingerprint database. *Res Microbiol* **151**:343-51.
210. **Supply, P., C. Allix, S. Lesjean, M. Cardoso-Oelemann, S. Rusch-Gerdes, E. Willery, E. Savine, P. de Haas, H. van Deutekom, S. Roring, P. Bifani, N. Kurepina, B. Kreiswirth, C. Sola, N. Rastogi, V. Vatin, M. C. Gutierrez, M. Fauville, S. Niemann, R. Skuce, K. Kremer, C. Locht, and D. van Soolingen.** 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **44**:4498-510.
211. **Supply, P., S. Lesjean, E. Savine, K. Kremer, D. van Soolingen, and C. Locht.** 2001. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* **39**:3563-71.
212. **Supply, P., J. Magdalena, S. Himpens, and C. Locht.** 1997. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Mol Microbiol* **26**:991-1003.
213. **Tailleux, L., S. J. Waddell, M. Pelizzola, A. Mortellaro, M. Withers, A. Tanne, P. R. Castagnoli, B. Gicquel, N. G. Stoker, P. D. Butcher, M. Foti, and O. Neyrolles.** 2008. Probing host pathogen cross-talk by transcriptional profiling of both *Mycobacterium tuberculosis* and infected human dendritic cells and macrophages. *PLoS One* **3**:e1403.
214. **Theus, S., K. Eisenach, N. Fomukong, R. F. Silver, and M. D. Cave.** 2007. Beijing family *Mycobacterium tuberculosis* strains differ in their intracellular growth in THP-1 macrophages. *Int J Tuberc Lung Dis* **11**:1087-93.
215. **Theus, S. A., M. D. Cave, K. Eisenach, J. Walrath, H. Lee, W. Mackay, C. Whalen, and R. F. Silver.** 2006. Differences in the growth of paired Ugandan isolates of *Mycobacterium tuberculosis* within human mononuclear phagocytes correlate with epidemiological evidence of strain virulence. *Infect Immun* **74**:6865-76.
216. **Theus, S. A., M. D. Cave, and K. D. Eisenach.** 2004. Activated THP-1 cells: an attractive model for the assessment of intracellular growth rates of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Infect Immun* **72**:1169-73.

217. **Theus, S. A., M. D. Cave, and K. D. Eisenach.** 2005. Intracellular macrophage growth rates and cytokine profiles of *Mycobacterium tuberculosis* strains with different transmission dynamics. *J Infect Dis* **191**:453-60.
218. **Tsolaki, A. G., S. Gagneux, A. S. Pym, Y. O. Goguet de la Salmoniere, B. N. Kreiswirth, D. Van Soolingen, and P. M. Small.** 2005. Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **43**:3185-91.
219. **Tsolaki, A. G., A. E. Hirsh, K. DeRiemer, J. A. Enciso, M. Z. Wong, M. Hannan, Y. O. Goguet de la Salmoniere, K. Aman, M. Kato-Maeda, and P. M. Small.** 2004. Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:4865-70.
220. **Ulrichs, T., and S. H. Kaufmann.** 2006. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol* **208**:261-9.
221. **Valway, S. E., R. B. Greifinger, M. Papania, J. O. Kilburn, C. Woodley, G. T. DiFerdinando, and S. W. Dooley.** 1994. Multidrug-resistant tuberculosis in the New York State prison system, 1990-1991. *J Infect Dis* **170**:151-6.
222. **Valway, S. E., M. P. Sanchez, T. F. Shinnick, I. Orme, T. Agerton, D. Hoy, J. S. Jones, H. Westmoreland, and I. M. Onorato.** 1998. An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *N Engl J Med* **338**:633-9.
223. **van Deutekom, H., S. P. Hoijng, P. E. de Haas, M. W. Langendam, A. Horsman, D. van Soolingen, and R. A. Coutinho.** 2004. Clustered tuberculosis cases: do they represent recent transmission and can they be detected earlier? *Am J Respir Crit Care Med* **169**:806-10.
224. **van Deutekom, H., P. Supply, P. E. de Haas, E. Willery, S. P. Hoijng, C. Locht, R. A. Coutinho, and D. van Soolingen.** 2005. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat analysis, a more accurate method for identifying epidemiological links between patients with tuberculosis. *J Clin Microbiol* **43**:4473-9.
225. **van Embden, J. D., M. D. Cave, J. T. Crawford, J. W. Dale, K. D. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, C. Martin, R. McAdam, T. M. Shinnick, and et al.** 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* **31**:406-9.
226. **Van Embden, J. D., D. Van Soolingen, H. F. Heersma, A. J. De Neeling, M. E. Jones, M. Steiert, V. Grek, F. R. Mooi, and J. Verhoef.** 1996. Establishment of a European network for the surveillance of *Mycobacterium tuberculosis*, MRSA and penicillin-resistant pneumococci. *J Antimicrob Chemother* **38**:905-7.
227. **van Rie, A., T. C. Victor, M. Richardson, R. Johnson, G. D. van der Spuy, E. J. Murray, N. Beyers, N. C. Gey van Pittius, P. D. van Helden, and R. M. Warren.** 2005. Reinfection and mixed infection cause changing *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance patterns. *Am J Respir Crit Care Med* **172**:636-42.
228. **van Rie, A., R. Warren, M. Richardson, T. C. Victor, R. P. Gie, D. A. Enarson, N. Beyers, and P. D. van Helden.** 1999. Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N Engl J Med* **341**:1174-9.

229. **van Soolingen, D., M. W. Borgdorff, P. E. de Haas, M. M. Sebek, J. Veen, M. Dessens, K. Kremer, and J. D. van Embden.** 1999. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997. *J Infect Dis* **180**:726-36.
230. **van Soolingen, D., L. Qian, P. E. de Haas, J. T. Douglas, H. Traore, F. Portaels, H. Z. Qing, D. Enkhsaikan, P. Nymadawa, and J. D. van Embden.** 1995. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol* **33**:3234-8.
231. **Vassalli, P.** 1992. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* **10**:411-52.
232. **Verver, S., R. M. Warren, Z. Munch, M. Richardson, G. D. van der Spuy, M. W. Borgdorff, M. A. Behr, N. Beyers, and P. D. van Helden.** 2004. Proportion of tuberculosis transmission that takes place in households in a high-incidence area. *Lancet* **363**:212-4.
233. **Volpe, E., G. Cappelli, M. Grassi, A. Martino, A. Serafino, V. Colizzi, N. Sanarico, and F. Mariani.** 2006. Gene expression profiling of human macrophages at late time of infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology* **118**:449-60.
234. **Voskuil, M. I., D. Schnappinger, K. C. Visconti, M. I. Harrell, G. M. Dolganov, D. R. Sherman, and G. K. Schoolnik.** 2003. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. *J Exp Med* **198**:705-13.
235. **Vynnycky, E., and P. E. Fine.** 1997. The natural history of tuberculosis: the implications of age-dependent risks of disease and the role of reinfection. *Epidemiol Infect* **119**:183-201.
236. **Warren, R. M., E. M. Streicher, S. L. Sampson, G. D. van der Spuy, M. Richardson, D. Nguyen, M. A. Behr, T. C. Victor, and P. D. van Helden.** 2002. Microevolution of the direct repeat region of *Mycobacterium tuberculosis*: implications for interpretation of spoligotyping data. *J Clin Microbiol* **40**:4457-65.
237. **Warren, R. M., T. C. Victor, E. M. Streicher, M. Richardson, N. Beyers, N. C. Gey van Pittius, and P. D. van Helden.** 2004. Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen. *Am J Respir Crit Care Med* **169**:610-4.
238. **Warren, R. M., T. C. Victor, E. M. Streicher, M. Richardson, G. D. van der Spuy, R. Johnson, V. N. Chihota, C. Locht, P. Supply, and P. D. van Helden.** 2004. Clonal expansion of a globally disseminated lineage of *Mycobacterium tuberculosis* with low IS6110 copy numbers. *J Clin Microbiol* **42**:5774-82.
239. **Watson, J. M., Moss, F.** 2001. tuberculosis in Leicester: out of control, or just one of those things? *BMJ* **322**:1133-4.
240. **Weis, S. E., J. M. Pogoda, Z. Yang, M. D. Cave, C. Wallace, M. Kelley, and P. F. Barnes.** 2002. Transmission dynamics of tuberculosis in Tarrant county, Texas. *Am J Respir Crit Care Med* **166**:36-42.
241. **WHO.** 2008. Anti-tuberculosis drug resistance in the world :fourth global report. WHO/HTM/tuberculosis/2008.394.
242. **WHO.** 2002. An expanded DOTS framework for effective tuberculosis control. Geneva, Switzerland: WHO, 2002. WHO/CDS/tuberculosis/2002.297.
243. **WHO.** 2002. Expanding DOTS in the context of a changing health system. Geneva, WHO, 2002 .WHO/CDS/tuberculosis/2002.318.

244. **WHO.** 2006. Fact sheet, No 104, March 2006.
245. **WHO.** 2006. The Global Plan Stop tuberculosis, 2006-2015. WHO/HTM/STB/2006.ed.
246. **WHO.** 2008. Global tuberculosis control : surveillance, planning, financing : WHO report 2008. WHO/HTM/tuberculosis/2008.393.
247. **WHO.** 2009. Global tuberculosis control : epidemiology, strategy, financing : WHO report 2009. WHO/HTM/tuberculosis/2009.411.
248. **WHO.** 2006. Global tuberculosis control: surveillance, planning and financing. Geneva, Switzerland: WHO; 2006. Publication WHO/HTM/tuberculosis/2006.362.
249. **WHO.** 2002. The newsletter of the global partnership movement to Stop tuberculosis. 2002; 7.
250. **Wong, K. C., W. M. Leong, H. K. Law, K. F. Ip, J. T. Lam, K. Y. Yuen, P. L. Ho, W. S. Tse, X. H. Weng, W. H. Zhang, S. Chen, and W. C. Yam.** 2007. Molecular characterization of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and their association with phenotypic virulence in human macrophages. Clin Vaccine Immunol **14**:1279-84.
251. **Woods, G. L.** 2000. Susceptibility testing for mycobacteria. Clin Infect Dis **31**:1209-15.
252. **Yeh, R. W., P. C. Hopewell, and C. L. Daley.** 1999. Simultaneous infection with two strains of *Mycobacterium tuberculosis* identified by restriction fragment length polymorphism analysis. Int J Tuberc Lung Dis **3**:537-9.
253. **Yeh, R. W., A. Ponce de Leon, C. B. Agasino, J. A. Hahn, C. L. Daley, P. C. Hopewell, and P. M. Small.** 1998. Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA genotypes. J Infect Dis **177**:1107-11.
254. **Zhang, M., J. Gong, Z. Yang, B. Samten, M. D. Cave, and P. F. Barnes.** 1999. Enhanced capacity of a widespread strain of *Mycobacterium tuberculosis* to grow in human macrophages. J Infect Dis **179**:1213-7.

ANEXOS

ANEXO 1

Perfil transcriptómico celular común a la infección por todas las cepas de *M. tuberculosis*

ProbID	Description	CEPAS DE <i>M. tuberculosis</i>				
		H37Rv	Beijing 7	Beijing 4	Beijing 5	
Nivel de expresión génica en THP-1 con respecto a controles sin infectar						
A_24_P110591	Unknown	4,8	2,38	3,48	1,62	
A_24_P170103	Unknown	4,55	1,53	1,88	2,67	
A_24_P221375	Unknown	2,57	2,06	2,06	2,3	
A_24_P272653	Unknown	3,67	2,27	1,88	1,54	
A_24_P273245	Unknown	3,42	1,75	1,66	2,24	
A_24_P273284	Unknown	3,52	1,91	1,85	1,8	
A_24_P289504	Unknown	4,05	1,65	1,6	1,84	
A_24_P358337	Unknown	4,15	1,75	1,94	1,95	
A_24_P392505	Unknown	5,92	1,65	1,89	1,48	
A_24_P418780	Unknown	3,05	1,65	2,34	1,61	
A_24_P478940	Unknown	-12,53	-5,02	-11,11	-7,65	
A_24_P927205	Unknown	-2,8	-3,69	-16,03	-1,81	
A_32_P49552	Unknown	-12,69	-5,73	-5,67	-5,31	
A_32_P80295	Unknown	-4,45	-1,76	-2,94	-1,68	
AB014594	Homo sapiens mRNA for KIAA0694 protein	3,42	2,35	2,01	1,23	
AB029488	Homo sapiens C11orf21 mRNA	3,62	2,38	2,02	2,07	
AB051487	Homo sapiens mRNA for KIAA1700 protein	-3,63	-2,19	-2,46	-2,48	
AF009616	Homo sapiens FLAME-1 mRNA	-4,5	-1,75	-3,12	-2,52	
AF086044	Homo sapiens full length insert cDNA clone YX74D05. [AF086044]	-10,9	-2,55	-3,43	-2,26	
AF099011	Homo sapiens EH-domain containing protein testiin mRNA	-2,62	-1,63	-5,46	-1,98	
AK001884	Homo sapiens cDNA FLJ11022 fis	4,33	2	4,3	2,13	
AK022059	Homo sapiens cDNA FLJ11997 fis	3,45	2,14	2,11	1,73	
AK024680	Homo sapiens cDNA: FLJ21027 fis	-7,27	-2,69	-8,82	-3,37	
AK024924	Homo sapiens cDNA: FLJ21271 fis	-3,01	-1,58	-3,41	-2,5	
AK025758	Homo sapiens cDNA: FLJ22105 fis	3,52	2,15	4,62	2,24	
AK058169	Homo sapiens cDNA FLJ25440 fis	-31,54	-1,74	-4,19	-1,66	
AK074097	Homo sapiens mRNA for FLJ00168 protein. [AK074097]	-3,2	-2,42	-4,96	-2,39	
AK090499	Homo sapiens cDNA FLJ33180 fis	4,76	5,89	2,08	1,9	

AK090515	Homo sapiens cDNA FLJ33196 fis	-3,44	-2,82	-3,39	-2,65
AK092450	Homo sapiens cDNA FLJ35131 fis	-8,7	-2,1	-1,54	-3,37
AK097227	Homo sapiens cDNA FLJ39908 fis	3,92	3,71	2,23	1,94
AK124281	Homo sapiens cDNA FLJ42287 fis	-6,7	-2,92	-1,96	-3,34
AK124946	Homo sapiens cDNA FLJ42956 fis	4,45	6,05	3,55	2
AK125162	Homo sapiens cDNA FLJ43172 fis	-7,64	-1,79	-4,34	-2,55
AK126364	Homo sapiens cDNA FLJ44400 fis	-4,01	-2,62	-3,39	-2,71
AK127910	Homo sapiens cDNA FLJ46017 fis	-3,41	-1,66	-1,85	-1,51
AK128691	Homo sapiens cDNA FLJ46858 fis	-22,9	-2,81	-12,86	-3,42
AK130576	Homo sapiens cDNA FLJ27066 fis	-8,3	-2,74	-2,68	-4,49
AL713714	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp667C0715 (from clone DKFZp667C0715) [AL713714]	1,74	1,69	3,71	1,29
AL832481	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686J1719 (from clone DKFZp686J1719) [AL832481]	-3,18	-2,25	-3,81	-1,75
BC005081	Homo sapiens brevicin	2,95	5,6	2,32	1,61
BC007360	Homo sapiens hypothetical protein MGC16121	3,17	3,11	3,44	2,49
BC012317	Homo sapiens likely ortholog of mouse lung-inducible Neutralized-related C3HC4 RING domain protein	-23,74	-2,29	-3,11	-4,05
BC030083	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4791783. [BC030083]	3,93	2,36	4,62	2,36
BC031266	Homo sapiens ring finger protein 36	-5,14	-2,02	-2,75	-2,28
BC041366	Homo sapiens ubiquitin-specific peptidase 2	3,41	2,6	1,7	2,68
BC041772	Homo sapiens hypothetical protein LOC124976	9,42	5,88	8,73	3,8
BC046362	Homo sapiens transmembrane protein 37	1,82	1,65	4,55	1,94
BC063385	Homo sapiens T cell receptor alpha locus	4,94	3,56	2,34	2,68
BF109232	7_60c12.x1 Soares_NSF_F8_9W_OT_PA_P_S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3525886 3'	-3,63	-1,67	-4,19	-2,34
BG547557	BG547557 602575410F1 NIH_MGC_77 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4703546 5'	-29,38	-8,04	-1,83	-9,82
BM819787	BM819787 K-EST0087976 S16N667673 Homo sapiens cDNA clone S16N667673-2-E05 5'	-3,28	-1,89	-3,01	-3,45
BX102314	BX102314 Soares pineal gland 3NbHPG Homo sapiens cDNA clone IMAGE:998D02888 ; IMAGE:383185, mRNA sequence [BX102314]	4,64	1,89	2,02	1,56
BX640843	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686B14224	-4,21	-1,69	-6,04	-2,62

CR593560	Full-length cDNA clone CS0DC029YA18 of Neuroblastoma Cot 25-normalized of Homo sapiens (human). [CR593560]	-4,45	-1,94	-2,62	-3,9
CR603215	Full-length cDNA clone CS0DI023YC17 of Placenta Cot 25-normalized of Homo sapiens (human). [CR603215]	3,74	2,07	2,11	1,69
DB340110	DB340110 TEST14 Homo sapiens cDNA clone TEST14012827 3'	-3,7	-1,99	-1,86	-2,55
ENST00000245185	Full-length cDNA clone CS0DJ010YN14 of T cells (Jurkat cell line) Cot 10-normalized of Homo sapiens (human). [CR625648]	-17,1	-5,2	-11,01	-7,51
ENST00000262042	Homo sapiens mRNA for KIAA0960 protein	2,73	1,91	4,97	1,99
ENST00000287322	Homo sapiens BCL2-associated athanogene 4	3,3	1,96	1,62	2,22
ENST00000292729	Homo sapiens partial mRNA for ubiquitin specific proteinase 41 (USP41 gene). [AJ583822]	-7,89	-2,23	-1,83	-3,98
ENST00000313624	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp667P0410 (from clone DKFZp667P0410). [AL831953]	-9,06	-3,22	-2,38	-3,3
ENST00000326474	Homo sapiens Similar to LOC166075	3,92	2,45	4,08	2,22
ENST00000355095	Homo sapiens mRNA for KIAA1473 protein	3,16	1,61	2,27	1,68
ENST00000366569	Homo sapiens cDNA FLJ38396 fis	2,63	4,7	2,05	2,25
ENST00000377411	Homo sapiens cDNA: FLJ23230 fis	-2,53	-1,89	-3,77	-1,75
ENST00000379156	Full-length cDNA clone CS0DK002YF13 of HeLa cells Cot 25-normalized of Homo sapiens (human). [CR603904]	-4,53	-3,14	-1,68	-2,54
ENST00000381577	Unknown	-14,25	-1,98	-3,81	-5,12
ENST00000381961	Q9G7C4 (Q9G7C4) Cytochrome oxidase c subunit I (Fragment)	-4,94	-1,8	-5,59	-1,96
ENST00000382108	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686N20108 (from clone DKFZp686N20108). [BX648244]	-5,06	-2,11	-3,93	-2,6
NM_000016	Homo sapiens acyl-Coenzyme A dehydrogenase	5,33	3,16	5,17	1,97
NM_000022	Homo sapiens adenosine deaminase (ADA)	-8,76	-2,74	-5,6	-3,35
NM_000024	Homo sapiens adrenergic	3,31	3,34	3,52	2,37
NM_000067	Homo sapiens carbonic anhydrase II (CA2)	2,6	1,56	6,02	2,09
NM_000129	Homo sapiens coagulation factor XIII	2,7	3,7	2,74	2,06
NM_000161	Homo sapiens GTP cyclohydrolase 1 (dopa-responsive dystonia) (GCH1)	-12,3	-2,65	-4,54	-4,76
NM_000187	Homo sapiens homogentisate 1	-5,62	-1,89	-4,25	-2,75
NM_000235	Homo sapiens lipase A	2,02	2,56	4,03	1,82
NM_000237	Homo sapiens lipoprotein lipase (LPL)	12,95	5,08	5,09	3,31
NM_000245	Homo sapiens met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	-4,17	-2,96	-4,92	-4,11

NM_000265	Homo sapiens neutrophil cytosolic factor 1	-4,73	-2,92	-14,64	-3,81
NM_000408	Homo sapiens glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial) (GPD2)	-4,74	-2,46	-1,78	-1,77
NM_000474	Homo sapiens twist homolog 1 (acrocephalosyndactyly 3; Saethre-Chotzen syndrome) (Drosophila) (TWIST1), mRNA [NM_000474]	-2,31	-2,01	-3,65	-1,87
NM_000480	Homo sapiens adenosine monophosphate deaminase (isoform E) (AMPD3)	-3,55	-1,82	-6,63	-3,25
NM_000507	Homo sapiens fructose-1	4,23	2,26	2,5	2,02
NM_000527	Homo sapiens low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia) (LDLR)	-5,2	-2,37	-2,09	-2,16
NM_000582	Homo sapiens secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)	6,95	4,77	6,19	2,51
NM_000584	Homo sapiens interleukin 8 (IL8)	-7,53	-5,12	-30,61	-5,64
NM_000593	Homo sapiens transporter 1	-4,3	-1,89	-2,28	-2,17
NM_000636	Homo sapiens superoxide dismutase 2	-20,87	-9,93	-19,57	-12,61
NM_000675	Homo sapiens adenosine A2a receptor (ADORA2A)	-5,38	-1,81	-7,37	-1,67
NM_000677	Homo sapiens adenosine A3 receptor (ADORA3)	4,23	2,01	5,64	1,72
NM_000885	Homo sapiens integrin	1,97	1,62	4,42	1,12
NM_000943	Homo sapiens peptidylprolyl isomerase C (cyclophilin C) (PP1C)	1,53	2,11	3,46	1,43
NM_000952	Homo sapiens platelet-activating factor receptor (PTAFR)	-8,85	-2,39	-3,54	-3,02
NM_000956	Homo sapiens prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2)	-2,49	-3,62	-2,64	-2,27
NM_000960	Homo sapiens prostaglandin I2 (prostacyclin) receptor (IP) (PTGIR)	-5,76	-3,25	-6,02	-1,95
NM_000963	Homo sapiens prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) (PTGS2)	-26,37	-2,39	-6,05	-2,85
NM_000969	Homo sapiens ribosomal protein L5 (RPL5)	4,21	1,72	2,25	1,63
NM_001001396	Homo sapiens ATPase	6,2	2,84	7,5	2,82
NM_001001437	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3 (CCL3L3)	-13,35	-4,53	-15,83	-7,59
NM_001001547	Homo sapiens CD36 molecule (thrombospondin receptor) (CD36)	3	2,14	3,95	1,62
NM_001002811	Homo sapiens phosphodiesterase 4D interacting protein (myomegalin) (PDE4DIP)	-8,18	-2,4	-4,66	-2,63
NM_001008211	Homo sapiens optineurin (OPTN)	-4,56	-1,84	-2,9	-2,45
NM_001008493	Homo sapiens enabled homolog (Drosophila) (ENAH)	4,16	2,75	3,47	1,72
NM_001008540	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4)	-9,09	-1,89	-2,73	-2,51
NM_001012631	Homo sapiens interleukin 32 (IL32)	-8,4	-6,33	-8,43	-3,62

NM_001013002	Homo sapiens hect domain and RLD 6 (HERC6)	-11,23	-3,91	-3,04	-3,57
NM_001013398	Homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)	-1,72	-4,19	-6,95	-3,27
NM_001017986	Homo sapiens Fc-gamma receptor 1B2 (LOC440607)	3,47	2,42	10,16	1,88
NM_001034061	Homo sapiens chromosome 8 open reading frame 61 (C8orf61)	2,84	2,28	1,64	1,8
NM_001037341	Homo sapiens phosphodiesterase 4B	-27,65	-4,54	-6,88	-4,79
NM_001078	Homo sapiens vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1)	-17,54	-6,16	-2,12	-3,32
NM_001165	Homo sapiens baculoviral IAP repeat-containing 3 (BIRC3)	-11,81	-5,59	-9,24	-6,72
NM_001250	Homo sapiens CD40 molecule	-5,16	-2,21	-4,83	-2,66
NM_001337	Homo sapiens chemokine (C-X3-C motif) receptor 1 (CX3CR1)	28,77	4,52	44,87	5,55
NM_001360	Homo sapiens 7-dehydrocholesterol reductase (DHCR7)	-2,61	-2,81	-3,63	-1,58
NM_001423	Homo sapiens epithelial membrane protein 1 (EMP1)	5,64	28,84	1,78	1,99
NM_001442	Homo sapiens fatty acid binding protein 4	4,98	2,52	5,94	2,59
NM_001511	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity)	-65,46	-22,5	-64,41	-26,85
NM_001547	Homo sapiens interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2 (IFIT2)	-113	-15,1	-4,5	-30,04
NM_001548	Homo sapiens interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (IFIT1)	-31,19	-10,33	-5,78	-13,98
NM_001549	Homo sapiens interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (IFIT3)	-21,24	-7,3	-5,9	-12,3
NM_001561	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily	-9,98	-6,25	-8,98	-8,4
NM_001565	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10)	-25,37	-13,45	-5,05	-17,56
NM_001620	Homo sapiens AHNAK nucleoprotein (desmoyokin) (AHNAK)	1,96	3,03	3,36	1,73
NM_001677	Homo sapiens ATPase	7,53	2,9	9,43	3,21
NM_001718	Homo sapiens bone morphogenetic protein 6 (BMP6)	-10,24	-2,29	-8,39	-3,28
NM_001734	Homo sapiens complement component 1	-10,02	-1,83	-2,14	-4,09
NM_001769	Homo sapiens CD9 molecule (CD9)	2,49	4,61	2,05	1,64
NM_001775	Homo sapiens CD38 molecule (CD38)	-20,92	-3,99	-1,68	-5,77
NM_001778	Homo sapiens CD48 molecule (CD48)	-18,12	-6,97	-10,06	-7,14
NM_001823	Homo sapiens creatine kinase	-7,93	-1,77	-6,13	-1,87
NM_001838	Homo sapiens chemokine (C-C motif) receptor 7 (CCR7)	-49,23	-4,93	-53,41	-9,42
NM_001901	Homo sapiens connective tissue growth factor (CTGF)	-5,3	-3,07	-7,05	-2,5

NM_001953	Homo sapiens endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)	-3,73	-2,49	-3	-1,63
NM_001995	Homo sapiens acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	-5,96	-3,24	-4,72	-3,08
NM_002006	Homo sapiens fibroblast growth factor 2 (basic) (FGF2)	-3,93	-1,94	-2,27	-2,23
NM_002089	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2)	-24,08	-9,55	-22,32	-9,12
NM_002090	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 3 (CXCL3)	-25,69	-5,79	-16,58	-8,67
NM_002110	Homo sapiens hemopoietic cell kinase (HCK)	-4,81	-2,29	-5,86	-1,63
NM_002113	Homo sapiens complement factor H-related 1 (CFHR1)	-24,15	-1,84	-3,38	-3,07
NM_002114	Homo sapiens human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 1	-3,54	-1,88	-3,4	-1,54
NM_002136	Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	3,63	1,52	1,66	1,73
NM_002164	Homo sapiens indoleamine-pyrrole 2	-48,81	-8,59	-41,02	-12,26
NM_002185	Homo sapiens interleukin 7 receptor	-15,49	-2,25	-5,25	-4,03
NM_002213	Homo sapiens integrin	4,58	3,13	2,48	1,94
NM_002214	Homo sapiens integrin	-3,59	-1,92	-7,98	-1,59
NM_002340	Homo sapiens lanosterol synthase (2)	-4,08	-2,07	-3,55	-1,82
NM_002350	Homo sapiens v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	-6,4	-2,94	-2,32	-2,97
NM_002356	Homo sapiens myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	-12,37	-3,61	-2,43	-3,46
NM_002462	Homo sapiens myxovirus (influenza virus) resistance 1	-19,87	-8,93	-8,37	-9,33
NM_002463	Homo sapiens myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	-17,73	-6,05	-3,21	-5,98
NM_002522	Homo sapiens neuronal pentraxin I (NPTX1)	2,01	3,29	2,35	3,07
NM_002523	Homo sapiens neuronal pentraxin II (NPTX2)	-4,76	-3,23	-4,19	-1,97
NM_002534	Homo sapiens 2'	-5,41	-2,71	-1,84	-3,04
NM_002562	Homo sapiens purinergic receptor P2X	-5,45	-1,75	-2,04	-1,62
NM_002675	Homo sapiens promyelocytic leukemia (PML)	-3,41	-1,81	-2,06	-1,54
NM_002729	Homo sapiens homeobox	3,3	1,93	3,32	1,65
NM_002840	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase	-25,44	-7,4	-5,02	-7,5
NM_002844	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase	-2,8	-1,62	-5,58	-2,19
NM_002852	Homo sapiens pentraxin-related gene	-2,44	-4,29	-2,37	-3,58
NM_002888	Homo sapiens retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	-9,12	-2,67	-2,25	-2,85
NM_002890	Homo sapiens RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1	3,81	3,02	2,18	2,02

NM_002908	Homo sapiens v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)	-3,19	-1,88	-3,82	-1,88
NM_002970	Homo sapiens spermidine/spermine N1-acetyltransferase (SAT)	-5,62	-2,39	-1,69	-3,02
NM_002982	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)	-7,67	-6,72	-5,66	-7,73
NM_002983	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 3 (CCL3)	-9,72	-4,92	-14,89	-6,76
NM_002984	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 4 (CCL4)	-41,68	-26,37	-42,93	-21,72
NM_002993	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	-9,12	-7,39	-10,46	-8,23
NM_003037	Homo sapiens signaling lymphocytic activation molecule family member 1 (SLAMF1)	-4,75	-1,82	-3,92	-1,84
NM_003133	Homo sapiens signal recognition particle 9kDa (SRP9)	3,93	1,99	2,18	1,53
NM_003151	Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4)	-8,94	-3,12	-4,32	-2,3
NM_003498	Homo sapiens stannin (SNN)	-6,98	-3	-2,58	-2,39
NM_003641	Homo sapiens interferon induced transmembrane protein 1 (9-27) (FITM1)	-14,12	-4,3	-2,27	-7,91
NM_003679	Homo sapiens kynurenine 3-monooxygenase (kynurenine 3-hydroxylase) (KMO)	-5,46	-1,94	-3,44	-2,61
NM_003733	Homo sapiens 2'-5'-oligoadenylate synthetase-like (OASL)	-18,33	-7,18	-6,76	-9,17
NM_003764	Homo sapiens syntaxin 11 (STX11)	-7,45	-2,49	-4,27	-2,38
NM_003784	Homo sapiens serpin peptidase inhibitor	-13,79	-1,52	-11,44	-2,88
NM_003937	Homo sapiens kynureninase (L-kynurenine hydrolase) (KYNU)	-10,95	-4,1	-6,07	-4,75
NM_003955	Homo sapiens suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3)	-17,37	-3,39	-8,29	-2,33
NM_003986	Homo sapiens butyrobetaine (gamma)	6,51	2,21	2,52	3,11
NM_003998	Homo sapiens nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105) (NFKB1)	-5,1	-2,79	-5,19	-2,96
NM_004004	Homo sapiens gap junction protein	-8,94	-3,26	-7,06	-5,92
NM_004031	Homo sapiens interferon regulatory factor 7 (IRF7)	-5,88	-2,26	-2,1	-2,98
NM_004148	Homo sapiens ninjurin 1 (NINJ1)	-3,69	-1,62	-4,53	-1,91
NM_004165	Homo sapiens Ras-related associated with diabetes (RRAD)	-6,88	-4,89	-17,5	-5,88
NM_004235	Homo sapiens Kruppel-like factor 4 (gut) (KLF4)	2,67	3,56	2,31	1,74
NM_004265	Homo sapiens fatty acid desaturase 2 (FADS2)	-3,08	-3,69	-1,97	-1,55
NM_004591	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20)	-11,62	-2,4	-28,56	-11,45
NM_004633	Homo sapiens interleukin 1 receptor	-11,7	-2,62	-13,68	-5,35
NM_004833	Homo sapiens absent in melanoma 2 (AIM2)	-14,17	-1,91	-1,67	-7,81

NM_004887	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 14 (CXCL14)	-8,58	-4,5	-7,42	-6,76
NM_004906	Homo sapiens Wilms tumor 1 associated protein (WTAP)	-5,16	-2,13	-4,12	-1,67
NM_005025	Homo sapiens serpin peptidase inhibitor	5,65	4,91	4,13	1,95
NM_005032	Homo sapiens plastin 3 (T isoform) (PLS3)	-4,37	-2,23	-4,76	-2,71
NM_005064	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 23 (CCL23)	-3,67	-1,96	-1,91	-2,4
NM_005084	Homo sapiens phospholipase A2	-20,76	-2,18	-4,01	-2,9
NM_005098	Homo sapiens musculin (activated B-cell factor-1) (MSC)	-2,28	-1,85	-9,37	-2,14
NM_005101	Homo sapiens ISG15 ubiquitin-like modifier (ISG15)	-10,5	-2,9	-3,22	-5,28
NM_005110	Homo sapiens glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2 (GFPT2)	-14,95	-3,26	-11,79	-4,57
NM_005114	Homo sapiens heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 1 (HS3ST1)	5,84	2,88	2,98	1,65
NM_005168	Homo sapiens Rho family GTPase 3 (RND3)	-5,72	-1,64	-3,56	-2,46
NM_005178	Homo sapiens B-cell CLL/lymphoma 3 (BCL3)	-4,66	-3,27	-8,57	-2,81
NM_005191	Homo sapiens CD80 molecule (CD80)	-14,51	-2,49	-5,55	-2,39
NM_005204	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8 (MAP3K8)	-3,61	-1,83	-3,6	-2,32
NM_005239	Homo sapiens v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)	-3,89	-1,8	-2,27	-1,6
NM_005300	Homo sapiens G protein-coupled receptor 34 (GPR34)	1,71	2,23	6,92	1,74
NM_005409	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 11 (CXCL11)	-41,11	-8,27	-2,95	-16,22
NM_005410	Homo sapiens selenoprotein P	1,66	2,5	7,04	1,99
NM_005429	Homo sapiens vascular endothelial growth factor C (VEGFC)	-2,32	-1,74	-3,5	-3,02
NM_005449	Homo sapiens Fas apoptotic inhibitory molecule 3 (FAIM3)	1,9	3,74	1,8	1,92
NM_005533	Homo sapiens interferon-induced protein 35 (IFI35)	-3,63	-1,96	-1,87	-2,33
NM_005621	Homo sapiens S100 calcium binding protein A12 (calgranulin C) (S100A12)	-4,23	-3,39	-2,02	-4,45
NM_005623	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 8 (CCL8)	-86,97	-22,32	-6,77	-52,87
NM_005658	Homo sapiens TNF receptor-associated factor 1 (TRAF1)	-4,88	-2,23	-10,08	-2,66
NM_005693	Homo sapiens nuclear receptor subfamily 1	-15,74	-3,71	-3,92	-3,84
NM_005746	Homo sapiens pre-B-cell colony enhancing factor 1 (PBEF1)	-6,61	-1,73	-5,65	-3,55
NM_005755	Homo sapiens Epstein-Barr virus induced gene 3 (EBI3)	-10,53	-2,64	-12,31	-5,24
NM_005806	Homo sapiens oligodendrocyte lineage transcription factor 2 (OLIG2)	-4,16	-1,75	-5,26	-2,64
NM_005842	Homo sapiens sprouty homolog 2 (Drosophila) (SPRY2)	2,88	7,25	3,19	2
NM_005946	Homo sapiens metallothionein 1A (functional) (MT1A)	-9,83	-3,91	-6,27	-4,2

NM_005947	Homo sapiens metallothionein 1B (functional) (MT1B)	-12,28	-4,29	-7,31	-5,65
NM_005949	Homo sapiens metallothionein 1F (functional) (MT1F)	-5,68	-2,66	-2,99	-2,34
NM_005950	Homo sapiens metallothionein 1G (MT1G)	-11,26	-5,5	-10,08	-5,13
NM_005951	Homo sapiens metallothionein 1H (MT1H)	-8,97	-3,62	-6,46	-4,15
NM_005952	Homo sapiens metallothionein 1X (MT1X)	-7,4	-3,64	-6,78	-4,17
NM_005953	Homo sapiens metallothionein 2A (MT2A)	-20,81	-5,9	-11,97	-7,56
NM_006018	Homo sapiens G protein-coupled receptor 109B (GPR109B)	-8,88	-1,55	-4,69	-3,1
NM_006058	Homo sapiens TNFAIP3 interacting protein 1 (TNIP1)	-4,75	-2,21	-4,95	-2,3
NM_006074	Homo sapiens tripartite motif-containing 22 (TRIM22)	-20,43	-5,36	-2,05	-7,04
NM_006080	Homo sapiens sema domain	-3,47	-2,95	-2,37	-3,53
NM_006084	Homo sapiens interferon-stimulated transcription factor 3	-3,05	-2,24	-4,34	-1,51
NM_006187	Homo sapiens 2'-5'-oligoadenylate synthetase 3	-6,12	-3,99	-2,58	-2,44
NM_006197	Homo sapiens pericentriolar material 1 (PCM1)	2,97	1,97	4,19	1,78
NM_006216	Homo sapiens serpin peptidase inhibitor	-11,22	-3,99	-7,47	-4,89
NM_006274	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 19 (CCL19)	-10,17	-10,44	-11,82	-3,38
NM_006290	Homo sapiens tumor necrosis factor	-3,2	-2,07	-6,81	-2,46
NM_006291	Homo sapiens tumor necrosis factor	-9,57	-3,49	-9,79	-2,29
NM_006417	Homo sapiens interferon-induced protein 44 (IFI44)	-16,81	-3,8	-2,57	-7,77
NM_006419	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 13 (B-cell chemoattractant) (CXCL13)	-36,93	-16,26	-21,72	-11,58
NM_006498	Homo sapiens lectin	-19,49	-4,24	-3,17	-3,88
NM_006509	Homo sapiens v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B	-3,06	-2,8	-4,86	-2,68
NM_006573	Homo sapiens tumor necrosis factor (ligand) superfamily	-31,43	-4,81	-1,6	-8,99
NM_006639	Homo sapiens cysteinyl leukotriene receptor 1 (CYSLTR1)	3,97	5,53	5,5	1,97
NM_006734	Homo sapiens human immunodeficiency virus type 1 enhancer binding protein 2 (HIVEP2)	-8	-2,17	-3,06	-2,29
NM_006763	Homo sapiens BTG family	-2,14	-2,06	-4,57	-1,68
NM_006795	Homo sapiens EH-domain containing 1 (EHD1)	-3,63	-2,37	-10,45	-4,86
NM_006820	Homo sapiens interferon-induced protein 44-like (IFI44L)	-48,65	-8,6	-4,62	-17,04
NM_006875	Homo sapiens pim-2 oncogene (PIM2)	-6,09	-3,76	-10,16	-2,05
NM_007115	Homo sapiens tumor necrosis factor	-38,19	-18,51	-34,72	-25,63

NM_007155	Homo sapiens zona pellucida glycoprotein 3 (sperm receptor) (ZP3)	-6,04	-3,29	-6	-3,29
NM_007199	Homo sapiens interleukin-1 receptor-associated kinase 3 (IRAK3)	-5,34	-2,22	-2,28	-2,05
NM_007256	Homo sapiens solute carrier organic anion transporter family	3,96	3,34	2,69	2,31
NM_007268	Homo sapiens V-set and immunoglobulin domain containing 4 (VSIG4)	3,52	2,43	3,34	2,01
NM_007283	Homo sapiens monoglyceride lipase (MGLL)	-2,23	-2,22	-7,67	-2,19
NM_007315	Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 1	-8,45	-3,63	-2,3	-3
NM_012068	Homo sapiens activating transcription factor 5 (ATF5)	-3,59	-2,22	-4,71	-2,23
NM_012420	Homo sapiens interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5 (IFIT5)	-6,28	-2,49	-1,72	-2,33
NM_014020	Homo sapiens LR8 protein (LR8)	-4,64	-2,96	-2,28	-1,85
NM_014033	Homo sapiens methyltransferase like 7A (METTL7A)	2,56	2,62	4,81	1,91
NM_014059	Homo sapiens response gene to complement 32 (RGC32)	4,88	3,49	2,37	1,94
NM_014224	Homo sapiens pepsinogen 5	3,96	2,29	2,88	2,31
NM_014314	Homo sapiens DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58 (DDX58)	-22,56	-4,39	-3,37	-12,11
NM_014350	Homo sapiens tumor necrosis factor	-4,25	-2	-3,14	-2,8
NM_014358	Homo sapiens C-type lectin domain family 4	-29,34	-11,2	-13,71	-8,95
NM_014398	Homo sapiens lysosomal-associated membrane protein 3 (LAMP3)	-147,6	-23,41	-96,23	-22,77
NM_014454	Homo sapiens sestrin 1 (SESN1)	6,99	3,16	6,08	2,45
NM_014644	Homo sapiens phosphodiesterase 4D interacting protein (myomegalin)	-3,64	-1,7	-4,87	-2,16
NM_014702	Homo sapiens KIAA0408 (KIAA0408)	-3,38	-2,05	-1,61	-1,66
NM_014903	Homo sapiens neuron navigator 3 (NAV3)	-4,77	-2,71	-2,89	-2,24
NM_015149	Homo sapiens rat guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1	-5,1	-2,35	-1,82	-1,91
NM_015277	Homo sapiens neural precursor cell expressed	-4,86	-1,57	-2,64	-1,9
NM_015431	Homo sapiens tripartite motif-containing 58 (TRIM58)	2,67	2	3,63	1,7
NM_015833	Homo sapiens adenosine deaminase	3,61	4,38	1,87	1,51
NM_016184	Homo sapiens C-type lectin domain family 4	-3,8	-2,43	-1,59	-3,36
NM_016323	Homo sapiens hect domain and RLD 5 (HERC5)	-34,51	-6,83	-2,36	-6,27
NM_016422	Homo sapiens ring finger protein 141 (RNF141)	4,14	2,25	6,6	2,13
NM_016542	Homo sapiens serine/threonine protein kinase MST4 (MST4)	-3,62	-1,52	-3,01	-1,66
NM_016584	Homo sapiens interleukin 23	-88,49	-5,92	-56,05	-7,59
NM_016610	Homo sapiens toll-like receptor 8 (TLR8)	-4,87	-2,73	-1,63	-1,91

NM_016817	Homo sapiens 2'-5'-oligoadenylate synthetase 2	-11,57	-2,87	-2,84	-3,93
NM_017414	Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 18 (USP18)	-13,95	-2,55	-1,89	-5,72
NM_017585	Homo sapiens solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter)	-5,02	-5,5	-7,96	-3,69
NM_017654	Homo sapiens sterile alpha motif domain containing 9 (SAMD9)	-14,65	-2,63	-1,87	-5,58
NM_017694	Homo sapiens FLJ20160 protein (FLJ20160)	3,8	1,74	1,96	1,62
NM_017817	Homo sapiens RAB20	-6,74	-2,23	-2,9	-1,88
NM_018000	Homo sapiens dilute suppressor (DSU)	-3,41	-1,85	-4,06	-1,85
NM_018004	Homo sapiens transmembrane protein 45A (TMEM45A)	-5,94	-1,93	-4,18	-2,29
NM_018176	Homo sapiens leucine-rich repeat LGI family	8,16	2,92	3,77	3,37
NM_018370	Homo sapiens hypothetical protein FLJ11259 (FLJ11259)	-8,29	-3,5	-2,8	-2,51
NM_018476	Homo sapiens brain expressed	3,41	1,71	1,86	1,53
NM_018637	Homo sapiens sulfatase 2 (SULF2)	-12,4	-1,78	-2,65	-3,12
NM_018943	Homo sapiens tubulin	3,48	4,34	2,24	2,73
NM_019111	Homo sapiens major histocompatibility complex	-7,02	-2,16	-3,09	-2,4
NM_020190	Homo sapiens olfactomedin-like 3 (OLFML3)	2,58	1,52	3,77	2,72
NM_020529	Homo sapiens nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor	-10,42	-5,67	-9,65	-5,95
NM_020859	Homo sapiens shroom (SHRM)	-11,47	-3,73	-13,19	-7,85
NM_020914	Homo sapiens chromosome 17 open reading frame 27 (C17orf27)	-5,25	-1,68	-1,57	-1,92
NM_020980	Homo sapiens aquaporin 9 (AQP9)	-21,66	-5,85	-6	-3,91
NM_021111	Homo sapiens reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK)	1,86	2,66	3,74	1,86
NM_021181	Homo sapiens SLAM family member 7 (SLAMF7)	-14,32	-2,59	-7,27	-4,62
NM_021245	Homo sapiens myozenin 1 (MYOZ1)	7,13	2,8	5,29	3,98
NM_021999	Homo sapiens integral membrane protein 2B (ITM2B)	4,31	3,67	3	2,37
NM_022003	Homo sapiens FXYD domain containing ion transport regulator 6 (FXYD6)	-4,51	-1,55	-1,78	-1,73
NM_022168	Homo sapiens interferon induced with helicase C domain 1 (IFIH1)	-10,25	-3,25	-2,25	-4,24
NM_022359	Homo sapiens phosphodiesterase 4D interacting protein (myomegalin) (PDE4DIP)	-10,85	-2,53	-4,7	-3,16
NM_022361	Homo sapiens popeye domain containing 3 (POEDC3)	-1,88	-1,71	-6,01	-2,35
NM_022481	Homo sapiens centaurin	3,03	3,95	1,56	2,36
NM_022718	Homo sapiens matrix metalloproteinase 25 (MMP25)	-4,13	-1,6	-3,33	-1,62

NM_022743	Homo sapiens SET and MYND domain containing 3 (SMYD3)	1,92	2,4	6,66	1,69
NM_022750	Homo sapiens poly (ADP-ribose) polymerase family	-4,79	-2,36	-3,03	-2,05
NM_022783	Homo sapiens DEP domain containing 6 (DEPDC6)	2,41	2,27	4	2,09
NM_022893	Homo sapiens B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein) (BCL11A)	-7,35	-2,64	-3,09	-1,83
NM_023009	Homo sapiens MARCKS-like 1 (MARCKSL1)	1,19	-1,15	-6,2	-1,54
NM_023018	Homo sapiens NAD kinase (NADK)	-3,83	-1,89	-2,15	-1,66
NM_023923	Homo sapiens phosphatase and actin regulator 4 (PHACTR4)	-3,64	-1,77	-1,55	-1,65
NM_024080	Homo sapiens transient receptor potential cation channel	4,94	2,86	2,96	2,54
NM_024430	Homo sapiens proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 2 (PSTPIP2)	-3,3	-1,88	-3,38	-1,82
NM_024841	Homo sapiens hypothetical protein FLJ14213 (FLJ14213)	2,61	5,24	3,12	1,93
NM_025079	Homo sapiens zinc finger CCH-type containing 12A (ZC3H12A)	-7,29	-2,53	-9,91	-5,57
NM_025228	Homo sapiens TRAF3 interacting protein 3 (TRAF3IP3)	2,14	2,38	3,51	1,73
NM_030926	Homo sapiens integral membrane protein 2C (ITM2C)	2,35	4,09	3,02	2,79
NM_031419	Homo sapiens nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor	-7,64	-3,41	-3,66	-3,14
NM_031449	Homo sapiens hypothetical protein DKFZp76112123 (DKFZp76112123)	-3,18	-2,51	-3,34	-2,2
NM_031458	Homo sapiens poly (ADP-ribose) polymerase family	-9,08	-3,7	-2,15	-3,99
NM_031935	Homo sapiens hemicentin 1 (HMCN1)	3,54	1,69	2,22	3,05
NM_032029	Homo sapiens Fc receptor	-5,49	-3,53	-4,73	-2,59
NM_032181	Homo sapiens hypothetical protein FLJ13391 (FLJ13391)	-9,74	-1,58	-6,08	-2,19
NM_032413	Homo sapiens chromosome 15 open reading frame 48 (C15orf48)	-14,79	-1,54	-2,66	-1,63
NM_032597	Homo sapiens MS4A13 protein (NYD-SP21)	-4,82	-2,38	-2,17	-2,27
NM_032709	Homo sapiens chromosome 10 open reading frame 33 (C10orf33)	3,58	1,81	2,4	1,6
NM_032782	Homo sapiens hepatitis A virus cellular receptor 2 (HAVCR2)	2,8	3,74	3,83	1,57
NM_032793	Homo sapiens major facilitator superfamily domain containing 2	-2,42	-1,55	-6,47	-2,18
NM_032932	Homo sapiens RAB11 family interacting protein 4 (class II)	5,92	4,23	1,89	2,18
NM_033050	Homo sapiens succinate receptor 1 (SUCNR1)	1,76	2,63	4,68	1,73
NM_033109	Homo sapiens polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1 (PNPT1)	-8,97	-2,62	-1,61	-3,87
NM_033114	Homo sapiens zinc finger CCHC-type and RNA binding motif 1	3,21	1,82	1,91	1,73
NM_033181	Homo sapiens cannabinoid receptor 1 (brain) (CNR1)	7,77	3,37	2,02	2,27

NM_033255	Homo sapiens epithelial stromal interaction 1 (breast) (EPST11)	-11,38	-2,99	-3,33	-5,16
NM_033515	Homo sapiens Rho GTPase activating protein 18 (ARHGAP18)	3,87	2,35	3,96	1,87
NM_033554	Homo sapiens major histocompatibility complex	-5,5	-1,59	-2,88	-3,12
NM_052884	Homo sapiens sialic acid binding Ig-like lectin 11 (SIGLEC11)	3,53	1,95	6,85	1,83
NM_052941	Homo sapiens guanylate binding protein 4 (GBP4)	-20,95	-5,35	-3,28	-5,85
NM_052942	Homo sapiens guanylate binding protein 5 (GBP5)	-29,85	-4,4	-2,96	-6,71
NM_053036	Homo sapiens neuropeptide FF receptor 2 (NPFFR2)	-4,11	-1,86	-2,53	-3,75
NM_054027	Homo sapiens ankylosis	3,12	3,89	1,74	1,59
NM_080657	Homo sapiens radical S-adenosyl methionine domain containing 2	-28,19	-5,44	-2,55	-10,58
NM_080672	Homo sapiens phosphatase and actin regulator 3 (PHACTR3)	3,7	2,25	7,56	2,55
NM_080725	Homo sapiens sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae) (SRXN1)	-1,74	-1,54	-3,74	-1,64
NM_130848	Homo sapiens chromosome 5 open reading frame 20 (C5orf20)	-10,62	-3,82	-3,3	-3,95
NM_138287	Homo sapiens deltex 3-like (Drosophila) (DTX3L)	-4	-2,45	-1,8	-1,59
NM_138456	Homo sapiens basic leucine zipper transcription factor	-7,83	-2,29	-1,78	-3,71
NM_138553	Homo sapiens B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)	-7,62	-2,28	-2,89	-2,98
NM_138715	Homo sapiens macrophage scavenger receptor 1 (MSR1)	2,79	7	8,78	1,57
NM_138790	Homo sapiens phospholipase D family	2,36	1,8	1,73	3,81
NM_138983	Homo sapiens oligodendrocyte transcription factor 1 (OLIG1)	-7,24	-3,67	-3,52	-4,13
NM_139211	Homo sapiens homeodomain-only protein (HOP)	4,23	7,84	2,43	1,7
NM_139266	Homo sapiens signal transducer and activator of transcription 1	-13,64	-4,17	-3,11	-3,96
NM_144583	Homo sapiens ATPase	6,67	5,2	7,95	4,07
NM_145006	Homo sapiens sushi domain containing 3 (SUSD3)	2,82	2,6	5,01	1,54
NM_145172	Homo sapiens WD repeat domain 63 (WDR63)	-5,63	-2,18	-3,38	-2,25
NM_145244	Homo sapiens DNA-damage-inducible transcript 4-like (DDIT4L)	3,61	4,63	8,55	2,33
NM_145641	Homo sapiens apolipoprotein L	-5,82	-2,3	-1,8	-2,11
NM_147147	Homo sapiens blood vessel epicardial substance (BVES)	-3,78	-1,77	-1,85	-1,66
NM_152594	Homo sapiens sprouty-related	3,61	7,23	1,81	2
NM_152637	Homo sapiens methyltransferase like 7B (METTL7B)	3,35	2,02	2,38	2,73
NM_152703	Homo sapiens sterile alpha motif domain containing 9-like (SAMD9L)	-8,75	-2,92	-1,79	-3,61
NM_153259	Homo sapiens mucolipin 2 (MCOLN2)	-13,68	-4,06	-5,02	-3,78
NM_170601	Homo sapiens sialic acid acetyltransferase (SIAE)	3,12	2,34	3,91	1,83

NM_171997	Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 2 (USP2)	3,23	1,97	2,3	3,57
NM_172174	Homo sapiens interleukin 15 (IL15)	-7,98	-2,04	-1,92	-2,5
NM_172200	Homo sapiens interleukin 15 receptor	-14,57	-2,57	-5,07	-3,06
NM_172374	Homo sapiens interleukin 4 induced 1 (IL4I1)	-4,4	-2,75	-4,44	-2,58
NM_173490	Homo sapiens proline-rich protein PRP2 (PRP2)	-9,36	-3,01	-1,88	-4,51
NM_174896	Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 162 (C1orf162)	3,43	1,51	7,68	1,97
NM_175617	Homo sapiens metallothionein 1E (functional) (MT1E)	-8,68	-3,88	-5,05	-4,61
NM_176870	Homo sapiens metallothionein 1M (MT1M)	-4,66	-1,85	-3,04	-2,57
NM_178273	Homo sapiens paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha	-5,18	-2,58	-1,86	-2,21
NM_181724	Homo sapiens transmembrane protein 119 (TMEM119)	-2,08	-3,49	-15,66	-1,53
NM_181805	Homo sapiens protein kinase (cAMP-dependent	-4,23	-3,19	-6,57	-2,01
NM_182728	Homo sapiens solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter	3,4	2,29	2,61	2,31
NM_182757	Homo sapiens IBR domain containing 2 (IBRDC2)	-14,45	-4,77	-8,37	-5,02
NM_182790	Homo sapiens pre-B-cell colony enhancing factor 1 (PBEF1)	-5,17	-1,71	-5,86	-3,6
NM_182943	Homo sapiens procollagen-lysine	-4,99	-1,95	-1,53	-1,96
NM_198183	Homo sapiens ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6 (UBE2L6)	-4,04	-1,8	-2,11	-2,15
NM_201636	Homo sapiens thromboxane A2 receptor (TBXA2R)	2,14	3,43	1,63	1,7
NM_203282	Homo sapiens zinc finger protein 539 (ZNF539)	3,28	1,91	2,42	1,66
NM_207381	Homo sapiens tumor necrosis factor	4,83	3,69	1,67	2,15
NR_002804	Homo sapiens sialic acid binding Ig-like lectin	3,09	2,94	3,54	1,88
S67044	CD36=collagen type I/thrombospondin receptor [one exon] [human	3,78	1,92	4,07	1,63
THC2267829	Q80U67 (Q80U67) MKIAA0182 protein (Fragment)	2,56	3,5	1,53	2,81
THC2270231	PBEF_HUMAN (P43490) Pre-B cell enhancing factor precursor	-6,31	-1,79	-5,61	-3,37
THC2282028	Unknown	3,21	2,5	5,75	2,06
THC2313495	ALU6_HUMAN (P39193) Alu subfamily SP sequence contamination warning entry	-7,06	-3,11	-4,4	-2,48
THC2364440	U84B_HUMAN (Q9UH99) Sad1/unc-84-like protein 2 (Rab5 interacting protein)	-4,37	-1,69	-1,52	-1,83
THC2365798	MT1L_HUMAN (P80297) Metallothionein-IL (MT-1L) (MT1X)	-3,84	-1,93	-2,63	-1,54
THC2375159	RB7B_HUMAN (Q96AH8) Ras-related protein Rab-7b	6,48	1,86	2,42	1,92
THC2411433	AF246221 transmembrane protein BRI {Homo sapiens;}	3,18	3,09	1,86	2,23

THC2432207	Unknown	4,25	1,8	4,85	1,75
THC2437881	Q9NBA9 (Q9NBA9) Stretchin-MLCK (Fragment)	3,85	1,57	4,91	1,98
THC2438999	Unknown	-7,93	-1,92	-3,51	-2,63
THC2446669	Unknown	1,59	2,13	7,29	2,4
THC2448349	ALU1_HUMAN (P39188) Alu subfamily J sequence contamination warning entry	-13,01	-3,89	-6,66	-4,85
W60781	W60781 W60781 zd26f05.r1 Soares_Fetal_Heart_NbHH19W Homo sapiens cDNA clone IMAGE:341793 5' similar to gb.J02874 FATTY ACID-BINDING PROTEIN, ADIPOCYTE (HUMAN);.. mRNA sequence [W60781]	3,14	1,78	5,07	2,3
X97261	H.sapiens mRNA for metallothionein isoform 1R. [X97261]	-9,89	-4,4	-5,73	-4,67

ANEXO 2

Perfil transcriptómico celular común a la infección por las cepas
Beijing

Probeld_Description	CEPAS DE <i>M. tuberculosis</i>				
	H37Rv	Beijing 7	Beijing 4	Beijing 5	
A_24_P153324 Unknown	2,56	1,46	1,22	1,33	
A_24_P489399 Unknown	3,8	1,38	1,44	1,03	
AK025221 Homo sapiens cDNA: FLJ21568 fis	-3,3	-1,5	-1,21	-1,48	
AK130118 Homo sapiens cDNA FLJ26608 fis	-3,35	1,02	1,33	-1,44	
NM_000397 Homo sapiens cytochrome b-245	-3,11	-1,28	1,02	1,04	
NM_000647 Homo sapiens chemokine (C-C motif) receptor 2 (CCR2)	1,27	2,18	13,82	2,02	
NM_001252 Homo sapiens tumor necrosis factor (ligand) superfamily	-4,25	-1,34	1,03	-1,32	
NM_001637 Homo sapiens acylglyoxylase (neutrophil) (AOAH)	-3,17	-1,16	1,1	-1,42	
NM_002155 Homo sapiens heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B) (HSPA6)	-3,26	-1,39	1,13	-1,24	
NM_002222 Homo sapiens inositol 1	-3,63	-1,43	1,02	-1,48	
NM_002309 Homo sapiens leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor) (LIF)	-4,9	1,37	-1,45	-1,39	
NM_003633 Homo sapiens ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain) (ENC1)	3,56	1,08	1,04	1,19	
NM_004882 Homo sapiens CBF1 interacting corepressor (CIR)	-3,54	1,17	-1,41	-1,35	
NM_005170 Homo sapiens achaete-scute complex-like 2 (Drosophila) (ASCL2)	-3,92	-1,4	1,23	-1,36	
NM_005301 Homo sapiens G protein-coupled receptor 35 (GPR35)	-1,39	-2,56	-5,16	-1,57	
NM_005348 Homo sapiens heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic)	3,52	-1,03	1,19	1,28	
NM_005398 Homo sapiens protein phosphatase 1	-4,89	1,37	-1,04	-1,07	
NM_005574 Homo sapiens LIM domain only 2 (rhombotin-like 1) (LMO2)	1,48	2,53	7,32	1,77	
NM_006308 Homo sapiens heat shock 27kDa protein 3 (HSPB3)	-1,48	-1,65	-1,88	-3,44	
NM_006435 Homo sapiens interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D) (IFITM2)	-3,36	-1,39	1,31	-1,37	
NM_006850 Homo sapiens interleukin 24 (IL24)	-8,23	1,02	-1,48	-1,12	
NM_012385 Homo sapiens nuclear protein 1 (NUPR1)	-4,19	1,06	1,19	1,08	
NM_013322 Homo sapiens sorting nexin 10 (SNX10)	-3,3	1,12	1,15	-1,08	
NM_015549 Homo sapiens pleckstrin homology domain containing	-3,33	-1,09	-1,44	-1,22	
NM_015589 Homo sapiens sterile alpha motif domain containing 4A (SAMD4A)	-4,11	-1,02	-1,36	-1,25	
NM_021614 Homo sapiens potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel	-3,29	-1,32	1,28	-1,01	
NM_032977 Homo sapiens caspase 10	-3,42	-1,22	1,2	-1,38	
NM_033035 Homo sapiens thymic stromal lymphopoietin (TSLP)	-4,86	-1,01	1,11	-1,33	
NM_147189 Homo sapiens chromosome 8 open reading frame 72 (C8orf72)	-3,52	-1,07	-1,46	-1,27	

Nivel de expresión génica en THP-1 con respecto a controles sin infectar

ANEXO 3

**Perfil transcriptómico celular común a la infección por las cepas Beijing
de elevada virulencia**

ProbID	Description	CEPAS DE <i>M. tuberculosis</i>				
		H37Rv	Beijing 7	Beijing 4	Beijing 5	
A_24_P15502	Unknown	-3,4	-1,32	1,11	-1,64	
A_24_P298179	Unknown	-1,11	3,52	1,6	-1,07	
A_24_P850187	Unknown	2,91	1,34	1,12	1,68	
AK021798	Homo sapiens cDNA FLJ11736 fis	-3,69	-1,04	1,05	-1,71	
AK023743	Homo sapiens cDNA FLJ13681 fis	-3,74	1,06	1,08	-1,99	
AK094968	Homo sapiens cDNA FLJ37649 fis	-3,45	-1,09	1,08	-1,86	
AK128714	Homo sapiens cDNA FLJ46881 fis	1,35	1,9	3,73	1,33	
BC031655	Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 38	-4,32	-1,35	1,09	-1,84	
ENST00000299502	full-length cDNA clone CS0DH002YJ05 of T cells (Jurkat cell line) of Homo sapiens (human). [CR599277]	-8,51	2,47	4,32	1,26	
ENST00000339867	Unknown	-5,43	-1,46	1,07	-1,96	
ENST00000378953	Homo sapiens cDNA FLJ46914 fis	-3,27	-1,27	1,18	-2,04	
NM_000690	Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial) (ALDH2)	-6,01	-1,05	-1,04	-1,57	
NM_001005353	Homo sapiens adenylate kinase 3-like 1 (AK3L1)	-6,03	-1,12	-1,33	-2,76	
NM_002416	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9)	-16,73	-1,5	-1,26	-2,06	
NM_002485	Homo sapiens nibrin (NBN)	-3,66	-1,48	-1,21	-1,62	
NM_003299	Homo sapiens heat shock protein 90kDa beta (Grp94)	1,49	1,98	4,64	1,27	
NM_004120	Homo sapiens guanylate binding protein 2	-6,33	-1,47	1,13	-1,57	
NM_004331	Homo sapiens BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like (BNIP3L)	-3,64	-1,06	-1,11	-1,58	
NM_005849	Homo sapiens immunoglobulin superfamily	-5,41	-1,02	1,2	-1,58	
NM_007110	Homo sapiens telomerase-associated protein 1 (TEP1)	1,17	2,61	3,6	1,05	
NM_014306	Homo sapiens chromosome 22 open reading frame 28 (C22orf28)	-3,42	-1,07	1,36	-1,65	
NM_014491	Homo sapiens forkhead box P2 (FOXP2)	1,12	1,9	4,15	1,31	
NM_014506	Homo sapiens torsin family 1	-3,94	-1,4	-1,12	-1,76	
NM_014674	Homo sapiens ER degradation enhancer	-3,93	1,01	-1,29	-1,59	
NM_014923	Homo sapiens fibronectin type III domain containing 3A (FNDC3A)	1,05	3,75	1,78	1,09	
NM_015310	Homo sapiens pleckstrin and Sec7 domain containing 3 (PSD3)	-4,68	1,41	-1,28	-2,22	
NM_017447	Homo sapiens chromosome 21 open reading frame 91 (C21orf91)	-3,37	-1,05	-1,4	-1,85	
NM_018284	Homo sapiens guanylate binding protein 3 (GBP3)	-3,24	-1,3	1,4	-1,97	
NM_018295	Homo sapiens transmembrane protein 140 (TMEM140)	-8,67	-1,2	-1,37	-2,37	

NM_019001	Homo sapiens 5'-3' exoribonuclease 1 (XRN1)	-3,46	-1,13	-1,4	-1,66
NM_022908	Homo sapiens 5'-nucleotidase domain containing 2 (NT5DC2)	4,09	-1,03	1,06	1,82
NM_024021	Homo sapiens membrane-spanning 4-domains	1,23	1,68	4,78	1,5
NM_080839	Homo sapiens gamma-glutamyltransferase-like 4 (GGTL4)	-1,4	-1,58	-3,2	1,25
NM_145343	Homo sapiens apolipoprotein L	-4,05	-1,37	-1,44	-1,59
NM_152542	Homo sapiens protein phosphatase 1K (PP2C domain containing) (PPM1K)	-3,56	-1,34	1,02	-2,58
NM_194284	Homo sapiens claudin 23 (CLDN23)	-4,52	-1,47	1,06	-1,77
NM_198232	Homo sapiens ribonuclease	-1,7	1,67	4,5	1,48
NM_212482	Homo sapiens fibronectin 1 (FN1)	3,63	1,24	-1,24	1,62
THC2317110	Unknown	-5,18	-1,32	1,17	-2,66
THC2340539	Unknown	-4,07	-1,35	-1,5	-1,59
THC2377375	Unknown	-1,08	1,53	3,77	1,41
XM_211749	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC285047 (LOC285047)	-5,17	-1,32	-1,08	-2,57

ANEXO 4

Perfil transcriptómico celular específico de la infección por la cepa 4

Probeld_Description	Cepas de <i>M. tuberculosis</i>				
	H37Rv	Beijing 7	Beijing 4	Beijing 5	
A_23_P103951 Unknown	-1,54	4,56	-1,48	-1,61	
A_24_P58759 Unknown	3,24	1,53	1,4	1,54	
A_24_P650562 Unknown	3,03	2,13	1,39	1,76	
A_24_P7040 Unknown	-8,99	-1,9	1	-2,34	
A_24_P868905 Unknown	-5,29	-1,63	1,04	-2,36	
AA541413 AA541413 ni77g08.s1 NCI CGAP Pr12 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:982910	-2,27	-1,08	3,76	-1,86	
AJ227863 Homo sapiens partial mRNA; ID YG39-2B. [AJ227863]	-1,49	1,1	3,84	-1,13	
AK000675 Homo sapiens cDNA FLJ20668 fis	-1,5	-1,59	3,98	-1,01	
AK023663 Homo sapiens cDNA FLJ13601 fis	-4,92	-2,47	-1,45	-2,45	
AK074166 Homo sapiens mRNA for FLJ00239 protein. [AK074166]	-7,03	-1,66	2,21	-1,36	
BC015390 Homo sapiens hypothetical protein LOC644242	-1,28	-1,42	-4,08	-1,37	
BC029107 Homo sapiens formin 1	-3,53	-2,5	-1,36	-1,56	
BC036699 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5266296. [BC036699]	-1,4	4,58	-2,24	-1,4	
BC039503 Homo sapiens	-1,11	1,42	3,86	1,07	
BG216229 BG216229 RST35803 Athersys RAGE Library Homo sapiens cDNA	-3,52	1,27	1,75	-1,12	
BM461836 AGENCOURT_6418378 NIH_MGC_71 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5533889 5'	1,3	1,32	3,88	1,4	
ENST00000265271 Homo sapiens	-1,2	1,21	3,74	-1,25	
ENST00000270031 Unknown	-4,42	-1,9	1,04	-1,95	
ENST00000294663 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp451C2311 (from clone DKFZp451C2311); complete cds. [AL832451]	-5,4	-1,78	-1,11	-1,71	
ENST00000379426 Unknown	1,34	1,04	4,69	1,25	
NM_000211 Homo sapiens integrin	2,79	2,58	1,49	2,16	
NM_000399 Homo sapiens early growth response 2 (Krox-20 homolog	2,73	4,98	1,07	1,59	
NM_000569 Homo sapiens Fc fragment of IgG	-1,16	-1,13	4,87	1,08	
NM_000712 Homo sapiens biliverdin reductase A (BLVRA)	-3,19	-1,21	2,21	-1,05	
NM_001003395 Homo sapiens tumor protein D52-like 1 (TPD52L1)	1,28	1,4	6,12	1,31	
NM_001004346 Homo sapiens methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2-like	5,6	5,4	-1,2	-2,23	
NM_001010915 Homo sapiens protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 2 (PTPLAD2)	-1,47	1,27	3,61	-1,24	
NM_001425 Homo sapiens epithelial membrane protein 3 (EMP3)	-1,39	-1,01	-3,61	1,07	
NM_001465 Homo sapiens FYN binding protein (FYB-120/130) (FYB)	-2,57	-1,61	3,78	-1,11	

Nivel de expresión génica en THP-1 con respecto a controles sin infectar

NM_001553	Homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 7 (IGFBP7)	-1,01	1,06	3,75	-1,09
NM_001558	Homo sapiens interleukin 10 receptor	-4,41	-1,8	-1,35	-1,63
NM_001974	Homo sapiens egf-like module containing	-7,87	-2,61	-1,14	-2,15
NM_002053	Homo sapiens guanylate binding protein 1	-11,99	-3,17	-1,35	-3,44
NM_002291	Homo sapiens laminin	-6,9	-1,55	-1,37	-1,99
NM_002432	Homo sapiens myeloid cell nuclear differentiation antigen (MND A)	-5,87	1,02	4,75	1,13
NM_002531	Homo sapiens neurotensin receptor 1 (high affinity) (NTSR1)	2,18	4,62	1,38	1,75
NM_002607	Homo sapiens platelet-derived growth factor alpha polypeptide (PDGFA)	2,49	6,92	1,08	1,75
NM_002631	Homo sapiens phosphogluconate dehydrogenase (PGD)	-1,29	-1,32	-3,52	-1,2
NM_002648	Homo sapiens pim-1 oncogene (PIM1)	-1,39	3	-3,22	1,4
NM_002759	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2 (EIF2AK2)	-5,21	-2,49	-1,14	-2,64
NM_003020	Homo sapiens secretogranin V (7B2 protein) (SCG5)	2,67	3,44	-1,27	-1,8
NM_003039	Homo sapiens solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter)	-4,46	-1,25	1,69	-1,18
NM_003546	Homo sapiens histone 1	-1,5	-1,52	3,97	-1,33
NM_003656	Homo sapiens calcium/calmodulin-dependent protein kinase I (CAMK1)	5,43	1,87	1,31	3,13
NM_003810	Homo sapiens tumor necrosis factor (ligand) superfamily	-39,23	-5,65	-1,46	-9,51
NM_003865	Homo sapiens homeobox	-16,76	-3,03	1,18	-3,95
NM_004001	Homo sapiens Fc fragment of IgG	-2,2	1,21	3,6	-1,08
NM_004289	Homo sapiens nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3 (NFE2L3)	-6,04	-1,91	-1,14	-2,7
NM_004385	Homo sapiens chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican) (CSPG2)	-2,6	1,17	4,29	1,3
NM_004510	Homo sapiens SP110 nuclear body protein (SP110)	-5,99	-1,85	1,08	-2,8
NM_004536	Homo sapiens baculoviral IAP repeat-containing 1 (BIRC1)	-1,03	1,5	4,39	1,11
NM_004864	Homo sapiens growth differentiation factor 15 (GDF15)	1,8	5,83	-1,9	1,02
NM_005082	Homo sapiens tripartite motif-containing 25 (TRIM25)	-4,69	-2,08	-1,19	-2,1
NM_005195	Homo sapiens CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)	-3,12	-2,03	-1,03	-1,64
NM_005213	Homo sapiens cystatin A (stefin A) (CSTA)	-3,61	-2,24	-1,1	-1,71
NM_005218	Homo sapiens defensin	-2,39	-1,07	4,15	1,32
NM_005292	Homo sapiens G protein-coupled receptor 18 (GPR18)	1,01	1,31	6,22	-1,23
NM_005375	Homo sapiens v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian) (MYB)	-1,24	1,21	3,84	1,2
NM_005408	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 13 (CCL13)	-9,35	-2,21	-1,31	-1,92
NM_005415	Homo sapiens solute carrier family 20 (phosphate transporter)	3,17	6,71	-1,24	1,62
NM_005491	Homo sapiens chromosome X open reading frame 6 (CXorf6)	-1,41	1,3	-3,51	-1,27
NM_005874	Homo sapiens leukocyte immunoglobulin-like receptor	-3,1	-1,89	1,25	-1,51
NM_005892	Homo sapiens formin-like 1 (FMNL1)	-1,23	1,18	-4,28	1,12

NM_006128	Homo sapiens bone morphogenetic protein 1 (BMP1)	-1,26	-1,08	-3,45	1,2
NM_006207	Homo sapiens platelet-derived growth factor receptor-like (PDGFRL)	-5,27	-1,42	3,26	-1,44
NM_006273	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 7 (CCL7)	-1,88	1,52	-1,26	-4,11
NM_006505	Homo sapiens poliovirus receptor (PVR)	-1,43	-1,44	-3,72	-1,31
NM_006617	Homo sapiens nestin (NES)	2,98	3,56	1,16	1,8
NM_006682	Homo sapiens fibrinogen-like 2 (FGL2)	-3,5	-1,1	3,17	1,27
NM_006714	Homo sapiens sphingomyelin phosphodiesterase	-3,11	-1,45	1,56	-2,11
NM_006877	Homo sapiens guanosine monophosphate reductase (GMPR)	-10,16	-2,14	-1,45	-2,86
NM_007350	Homo sapiens pleckstrin homology-like domain	3,7	4,24	1,18	1,9
NM_013305	Homo sapiens ST8 alpha-N-acetyl-neuraminidase alpha-2	2,67	3,94	1,42	1,59
NM_014290	Homo sapiens tudor domain containing 7 (TDRD7)	-5,47	-2,37	-1,08	-2,29
NM_014788	Homo sapiens tripartite motif-containing 14 (TRIM14)	-1,52	1,14	3,65	-1,1
NM_015271	Homo sapiens tripartite motif-containing 2 (TRIM2)	3,52	6,32	1,47	1,68
NM_015444	Homo sapiens transmembrane protein 158 (TMEM158)	3	6,64	1,2	2,02
NM_016135	Homo sapiens ets variant gene 7 (TEL2 oncogene) (ETV7)	-8,26	-1,98	-1,36	-3,73
NM_016616	Homo sapiens thioredoxin domain containing 3 (spermatoozoa) (TXNDC3)	-3,91	-2,49	-1,09	-2,5
NM_017523	Homo sapiens XIAP associated factor-1 (BIRC4BP)	-7,2	-2,71	1,15	-3,84
NM_017631	Homo sapiens hypothetical protein FLJ20035 (FLJ20035)	-4,8	-2,17	-1,31	-2,17
NM_017742	Homo sapiens zinc finger	-3,62	-1,76	-1,21	-2,3
NM_018015	Homo sapiens chromosome X open reading frame 57 (CXorf57)	4,8	5,49	1,04	1,52
NM_018084	Homo sapiens KIAA1212 (KIAA1212)	-1,55	-1,02	3,34	-1,2
NM_018986	Homo sapiens SH3 domain and tetratricopeptide repeats 1 (SH3TC1)	4,07	1,95	1,2	1,84
NM_020182	Homo sapiens transmembrane	-1,45	1,03	-3,58	-1,29
NM_020954	Homo sapiens KIAA1618 (KIAA1618)	-4,07	-1,9	1,24	-1,69
NM_021034	Homo sapiens interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U) (IFITM3)	-7,54	-2,42	-1,03	-2,26
NM_021105	Homo sapiens phospholipid scramblase 1 (PLSCR1)	-6,96	-2,21	-1,39	-3,61
NM_021201	Homo sapiens membrane-spanning 4-domains	-9,48	-3,85	-1,46	-3,25
NM_021642	Homo sapiens Fc fragment of IgG	-2,52	1,27	4,32	1,21
NM_021913	Homo sapiens AXL receptor tyrosine kinase (AXL)	-4,13	-1,29	2,82	-1,15
NM_022147	Homo sapiens receptor transporter protein 4 (RTP4)	-6,88	-1,97	1,36	-3,46
NM_022154	Homo sapiens solute carrier family 39 (zinc transporter)	-4,01	-2,25	1,03	-2,26
NM_022349	Homo sapiens membrane-spanning 4-domains	-2,33	1,23	9,35	-1,04
NM_022731	Homo sapiens nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1 (NUCKS1)	1	1,02	4,39	1,1

NM_023068	Homo sapiens sialic acid binding Ig-like lectin 1	-7,54	-2,19	-1,02	-1,7
NM_024119	Homo sapiens likely ortholog of mouse D11lgp2 (LGP2)	-7,59	-2,04	-1,49	-2,63
NM_024944	Homo sapiens chondrolectin (CHODL)	6,71	4,59	1,19	2,14
NM_030781	Homo sapiens collectin sub-family member 12 (COLEC12)	-1,48	1,25	9,07	1,15
NM_030915	Homo sapiens hypothetical protein DKFZp566J091 (LBH)	3,27	5,16	-1,19	1,87
NM_032375	Homo sapiens AKT1 substrate 1 (proline-rich) (AKT1S1)	-1,25	-1,17	-3,79	1,26
NM_033034	Homo sapiens tripartite motif-containing 5 (TRIM5)	-7,8	-1,99	-1,32	-2,42
NM_033244	Homo sapiens promyelocytic leukemia (PML)	-4,3	-1,55	-1,49	-1,77
NM_053056	Homo sapiens cyclin D1 (CCND1)	1,59	4,51	-2,95	-1,49
NM_054114	Homo sapiens T-cell activation GTPase activating protein (TAGAP)	-3,96	-1,57	1,08	-1,53
NM_080881	Homo sapiens drebrin 1 (DBN1)	2,79	4,37	1,01	1,98
NM_144573	Homo sapiens nexilin (F actin binding protein) (NEXN)	-14,79	-2,08	1,07	-3,77
NM_145686	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 (MAP4K4)	2,57	3,49	-1,04	1,57
NM_145699	Homo sapiens apolipoprotein B mRNA editing enzyme	-12,56	-3,3	1,1	-4,41
NM_152565	Homo sapiens ATPase	2,18	3,58	1,16	2,64
NM_152649	Homo sapiens mixed lineage kinase domain-like (MLKL)	-3,89	-1,35	1,51	-1,36
NM_153374	Homo sapiens LysM	-3,25	-1,79	-1,16	-2,45
NM_153607	Homo sapiens adult retina protein (LOC153222)	-3,47	1,19	2,02	-1,37
NM_177401	Homo sapiens midnolin (MIDN)	-1,37	1,14	-3,77	1,04
NM_178841	Homo sapiens ring finger protein 166 (RNF166)	3,65	2,06	1,49	1,88
NM_181782	Homo sapiens nuclear receptor coactivator 7 (NCOA7)	-5,53	-2,42	1,14	-2,36
NM_198402	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase-like (proline instead of catalytic arginine)	1,06	1,28	4,03	1,31
NM_198679	Homo sapiens Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1 (RAPGEF1)	-1,46	-1,12	-4,41	-1,07
NM_207310	Homo sapiens coiled-coil domain containing 74B (CCDC74B)	4,15	1,72	1,17	2,02
NM_207630	Homo sapiens ATP-binding cassette	-6,79	-1,16	2,5	-1,28
NR_001590	Homo sapiens interferon induced transmembrane protein 4 pseudogene (IFITM4P) on chromosome 6 [NR_001590]	-4,02	-1,8	1,14	-1,9
NR_002837	Homo sapiens ubiquitin-conjugating enzyme E2M pseudogene 1 (UBE2MP1) on chromosome 16	1,03	-1,36	-3,29	1,32
THC2266610	BC007276 HSPA8 protein {Homo sapiens}; , partial (17%) [THC2266610]	3,09	1,85	1,05	1,58
THC2280837	HESX_HUMAN (Q9UBX0) Homeobox expressed in ES cells 1 (Homeobox protein ANF) (hAnf)	-7,57	-2,11	1,44	-2,84
THC2287287	Unknown	-9,01	-2,66	-1,09	-2,04
THC2335352	OXIDOREDUCTASE {Brucella melitensis}; , partial (5%) [THC2335352]	1,29	1,48	3,67	-1,34

THC2358845	Unknown	-1,49	1,05	3,84	-1,88
THC2437430	ALU7 HUMAN (P39194) Alu subfamily SQ sequence contamination warning entry	4,29	1,53	1,23	1,57
U16307	Homo sapiens glioma pathogenesis-related protein (GliPR) mRNA	1,18	1,24	3,33	1,14

ANEXO 5

Perfil transcriptómico celular específico de la infección por la cepa 7

Probeld_Description	CEPAS DE <i>M. tuberculosis</i>				
	H37Rv	Beijing 7	Beijing 4	Beijing 5	
A_23_P103951 Unknown	-1,54	4,56	-1,48	-1,61	
A_23_P202100 Unknown	-1,81	-1,29	-4,16	-1,55	
A_23_P252892 Unknown	-3,39	3,07	1,11	-1,05	
A_24_P298099 Unknown	3,56	1,21	1,63	1,61	
A_24_P306921 Unknown	3,27	1,11	1,77	1,66	
A_24_P332326 Unknown	3,38	1,39	1,78	1,69	
A_24_P384196 Unknown	3,54	1,46	2,06	1,66	
AA541413 AA541413 ni77g08.s1 NCI_CGAP_Pr12 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:982910	-2,27	-1,08	3,76	-1,86	
AF085848 Homo sapiens full length insert cDNA clone Y148C03. [AF085848]	-1,42	4,94	1,49	1,16	
AK026225 Homo sapiens cDNA: FLJ22572 fis	-7,75	-1,46	-2,3	-1,53	
AK094950 Homo sapiens cDNA FLJ37631 fis	-14,03	-1,49	-6,89	-3,4	
AK123972 Homo sapiens cDNA FLJ41978 fis	1,98	1,39	4,32	1,51	
AY358357 Homo sapiens clone DNA82364 GLTL1825 (UNQ1825) mRNA	3,57	-1,07	2,27	1,63	
BC017382 Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 53	-1,45	4,55	1,2	1,13	
BC036699 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5266296. [BC036699]	-1,4	4,58	-2,24	-1,4	
BC047030 Homo sapiens uridine phosphorylase 1	-1,14	3	-3,49	-1,75	
CR603982 full-length cDNA clone CS0DF021YL03 of Fetal brain of Homo sapiens (human). [CR603982]	1,99	1,36	3,58	1,98	
ENST00000222543 Homo sapiens cDNA FLJ26323 fis	-6,73	1,2	-3,18	-6,01	
ENST00000258451 Homo sapiens ubiquitin hydrolyzing enzyme I (UBH1) mRNA	-3,75	-1,49	-3,76	-1,75	
ENST00000339446 Homo sapiens hypothetical LOC387763	-25,54	-1,18	-2,68	-1,89	
ENST00000360954 Homo sapiens cDNA FLJ13661 fis	-5,63	-1,39	-8,98	-3,97	
NM_000094 Homo sapiens collagen	-1,68	-1,34	-12,9	-1,83	
NM_000189 Homo sapiens hexokinase 2 (HK2)	-6,59	1,18	-2,79	-2,27	
NM_000201 Homo sapiens intercellular adhesion molecule 1 (CD54)	-2,69	-1,31	-9,45	-2,52	
NM_000214 Homo sapiens jagged 1 (Alagille syndrome) (JAG1)	1,35	7,01	1,2	1,23	
NM_000565 Homo sapiens interleukin 6 receptor (IL6R)	-1,65	1,06	4,5	1,51	
NM_000574 Homo sapiens CD55 molecule	-1,17	3,88	-1,47	-1,5	
NM_000576 Homo sapiens interleukin 1	-8,53	2,94	-59,7	-15,79	
NM_000594 Homo sapiens tumor necrosis factor (TNF superfamily	-3,97	-1,26	-4,1	-2,02	
NM_000600 Homo sapiens interleukin 6 (interferon	-27,35	-1,47	-3,41	-2,18	
NM_000607 Homo sapiens orosomucoid 1 (ORM1)	-7,11	-1,35	-2,04	-2,38	

Nivel de expresión génica en THP-1 con respecto a controles sin infectar

NM_000608	Homo sapiens orosomucoid 2 (ORM2)	-5,91	-1,25	-1,74	-2,19
NM_000610	Homo sapiens CD44 molecule (Indian blood group) (CD44)	-2,67	-1,21	-3,26	-1,76
NM_000758	Homo sapiens colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage) (CSF2)	-11,06	-1,33	-5,21	-1,52
NM_001001852	Homo sapiens pim-3 oncogene (PIM3)	-2,6	-1,01	-4,12	-1,87
NM_001003827	Homo sapiens tripartite motif-containing 34 (TRIM34)	-3,35	-1,75	-1,43	-1,5
NM_001004341	Homo sapiens FLJ16478 protein (FLJ16478)	-3,47	-1,39	-6,18	-1,87
NM_001042413	Homo sapiens GLIS family zinc finger 3 (GLIS3)	-2,43	1,14	-4,33	-2,61
NM_001050	Homo sapiens somatostatin receptor 2 (SSTR2)	-10,04	-1,22	-3,05	-1,95
NM_001099	Homo sapiens acid phosphatase	2,3	1,1	4,56	1,54
NM_001115	Homo sapiens adenylate cyclase 8 (brain) (ADCY8)	1,07	2,76	-3,76	1,13
NM_001124	Homo sapiens adrenomedullin (ADM)	-4,04	2,04	-3,9	-1,94
NM_001351	Homo sapiens deleted in azoospermia-like (DAZL)	-3,62	1,01	-4,79	-3,69
NM_001552	Homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 4 (IGFBP4)	-2,77	1,13	-4,52	2,06
NM_001657	Homo sapiens amphiregulin (schwannoma-derived growth factor) (AREG)	-1,48	6,36	-2,3	-1,74
NM_001860	Homo sapiens solute carrier family 31 (copper transporters)	-1,3	3,4	-1,15	-1,44
NM_001887	Homo sapiens crystallin	3,86	1,49	3,45	2,13
NM_001964	Homo sapiens early growth response 1 (EGR1)	-2,22	10,65	-1,05	-1,3
NM_002183	Homo sapiens interleukin 3 receptor	-3,63	2,3	-3,34	-1,34
NM_002192	Homo sapiens inhibitor	-15,67	1,37	-9,57	-2,03
NM_002201	Homo sapiens interferon stimulated exonuclease gene 20kDa (ISG20)	-21,54	-1,13	-3,83	-8,22
NM_002205	Homo sapiens integrin	-1	1,93	-4,28	1,13
NM_002231	Homo sapiens CD82 molecule (CD82)	-2,55	-1,3	-5,45	-1,97
NM_002421	Homo sapiens matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase) (MMP1)	-1,66	13,07	-1,88	-1,49
NM_002426	Homo sapiens matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase) (MMP12)	-6,06	19,16	-5,21	-3,26
NM_002429	Homo sapiens matrix metalloproteinase 19 (MMP19)	-3,78	1,61	-3,14	-1,75
NM_002526	Homo sapiens 5'-nucleotidase	1,38	4,61	1,24	1,19
NM_002648	Homo sapiens pim-1 oncogene (PIM1)	-1,39	3	-3,22	1,4
NM_002658	Homo sapiens plasminogen activator	-3,16	-1,25	-1,98	-1,8
NM_002662	Homo sapiens phospholipase D1	-10,18	-1,49	-1,83	-2,22
NM_002906	Homo sapiens radixin (RDX)	-4,07	-1,32	-1,99	-1,59
NM_002928	Homo sapiens regulator of G-protein signalling 16 (RGS16)	-3,09	1,43	-5,83	-3,59
NM_002981	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 1 (CCL1)	-6,83	-1,12	-7,41	-4,44
NM_003358	Homo sapiens UDP-glucose ceramide glucosyltransferase (UGCG)	-3,36	1,17	-1,6	-2,19
NM_003392	Homo sapiens wingless-type MMTV integration site family	-5,78	-1,38	-1,77	-2,12

NM_003821	Homo sapiens receptor-interacting serine-threonine kinase 2 (RIPK2)	-5.99	-1.03	-2.47	-2.11
NM_003879	Homo sapiens CASP8 and FADD-like apoptosis regulator (CFLAR)	-3.63	-1.45	-3.16	-2.19
NM_003897	Homo sapiens immediate early response 3 (IER3)	-9.98	1.17	-23.28	-6.52
NM_003900	Homo sapiens sequestosome 1 (SQSTM1)	-2.56	-1.17	-4.28	-1.62
NM_004024	Homo sapiens activating transcription factor 3 (ATF3)	-2.37	2.01	-4.15	-1.77
NM_004073	Homo sapiens polo-like kinase 3 (Drosophila) (PLK3)	-2.22	1.18	-4.84	-1.96
NM_004126	Homo sapiens guanine nucleotide binding protein (G protein)	-1.73	1.65	-3.77	-1.52
NM_004233	Homo sapiens CD83 molecule (CD83)	-4.52	-1.36	-7.33	-1.63
NM_004267	Homo sapiens carbohydrate (N-acetylglucosamine-6-O) sulfotransferase 2 (CHST2)	-2.95	1.17	-4.09	-2.51
NM_004417	Homo sapiens dual specificity phosphatase 1 (DUSP1)	-6.61	-1.43	-4.74	-2.17
NM_004418	Homo sapiens dual specificity phosphatase 2 (DUSP2)	-2.02	2.01	-4.37	-1.51
NM_004419	Homo sapiens dual specificity phosphatase 5 (DUSP5)	-3.04	4.17	-5.89	-2.06
NM_004760	Homo sapiens serine/threonine kinase 17a (apoptosis-inducing) (STK17A)	-2.53	-1.35	-4.3	-2.31
NM_004776	Homo sapiens UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1	-4.49	-1.05	-3.24	-2.03
NM_005194	Homo sapiens CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)	-3.34	-1.05	-6.36	-1.82
NM_005532	Homo sapiens interferon	-17.45	-1.37	-1.6	-4.47
NM_005618	Homo sapiens delta-like 1 (Drosophila) (DLL1)	-3.39	-1.44	-1.91	-1.91
NM_005729	Homo sapiens peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F) (PP1F)	-1.66	-1.12	-7.08	-2.03
NM_005771	Homo sapiens dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9 (DHRS9)	-1.58	1.24	4.89	1.52
NM_006096	Homo sapiens N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1)	-3.98	-1.14	-3.22	-1.65
NM_006273	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 7 (CCL7)	-1.88	1.52	-1.26	-4.11
NM_006287	Homo sapiens tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor) (TFPI)	-4.91	-1.08	-2.35	-2.42
NM_006379	Homo sapiens sema domain	-3.28	-1.39	-3.82	-1.97
NM_006714	Homo sapiens sphingomyelin phosphodiesterase	-3.11	-1.45	1.56	-2.11
NM_006769	Homo sapiens LIM domain only 4 (LMO4)	-2.49	-1.03	-3.55	-1.99
NM_006779	Homo sapiens CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 2 (CDC42EP2)	-3.35	-1.16	-4.57	-1.52
NM_006843	Homo sapiens serine dehydratase (SDS)	-6.66	1.25	-1.74	-1.41
NM_012323	Homo sapiens v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian) (MAFF)	-2.47	-1.11	-7.85	-1.92
NM_012334	Homo sapiens myosin X (MYO10)	-3.35	1.63	-2.25	-2.04
NM_012342	Homo sapiens BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog (Xenopus laevis) (BAMBI)	-4.71	1.03	-2.84	-2.06
NM_012454	Homo sapiens T-cell lymphoma invasion and metastasis 2 (TIAM2)	-5.98	-1.43	-4.35	-2.05
NM_013957	Homo sapiens neuregulin 1 (NRG1)	-4.67	1.68	-2.51	-2.69

NM_014331	Homo sapiens solute carrier family 7	-4,88	-1,19	-7,51	-3,58
NM_014344	Homo sapiens four jointed box 1 (Drosophila) (FJX1)	-2,83	-1,24	-4,42	-1,98
NM_015150	Homo sapiens raft-linking protein (RAFTLIN)	-3,21	-1,16	-4,48	-2
NM_015213	Homo sapiens RAB6 interacting protein 1 (RAB6IP1)	-3,35	-1,22	-3,15	-1,59
NM_015359	Homo sapiens solute carrier family 39 (zinc transporter)	-1,81	1,08	-3,99	-2,59
NM_015577	Homo sapiens retinoic acid induced 14 (RAI14)	-2,4	1,03	-3,92	-1,53
NM_015714	Homo sapiens G0/G1 switch 2 (G0S2)	-3,13	-1,23	-3,2	-2,38
NM_016354	Homo sapiens solute carrier organic anion transporter family	-1,63	3,34	-2,92	-1,49
NM_018147	Homo sapiens Fas apoptotic inhibitory molecule (FAIM)	-3,79	-1,3	-1,57	-1,75
NM_018192	Homo sapiens leprecan-like 1 (LEPREL1)	-3,85	1,17	-10,55	-6,23
NM_018965	Homo sapiens triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2)	3,33	1,26	3,15	2,2
NM_019058	Homo sapiens DNA-damage-inducible transcript 4 (DDIT4)	-3,95	-1,36	-2,49	-1,64
NM_019618	Homo sapiens interleukin 1 family	-11,72	-1,02	-3,17	-1,28
NM_020530	Homo sapiens oncostatin M (OSM)	-2,91	-1,12	-4,5	-1,68
NM_022143	Homo sapiens leucine rich repeat containing 4 (LRRC4)	3,39	1,48	4,1	1,81
NM_025245	Homo sapiens pre-B-cell leukemia transcription factor 4 (PBX4)	-4,23	-1,25	-2,39	-1,56
NM_030762	Homo sapiens basic helix-loop-helix domain containing	-4,04	1,1	-5,45	-2,32
NM_030964	Homo sapiens sprouty homolog 4 (Drosophila) (SPRY4)	-1,91	3,49	-2,99	-1,3
NM_130446	Homo sapiens kelch-like 6 (Drosophila) (KLHL6)	-3,73	1,56	-1,21	-1,26
NM_133467	Homo sapiens Cbp/p300-interacting transactivator	-1,09	3,78	1,01	1,46
NM_138461	Homo sapiens transmembrane 4 L six family member 19 (TM4SF19)	1,34	5,1	-1,65	1,21
NM_139164	Homo sapiens START domain containing 4	-3,83	-1,26	-2,08	-1,66
NM_145804	Homo sapiens ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2 (ABTB2)	-8,52	-1,32	-5,72	-1,87
NM_152450	Homo sapiens family with sequence similarity 81	3,73	1,35	2,98	2,15
NM_152572	Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 98 (C9orf98)	-4,15	-1,29	-5,52	-1,56
NM_152858	Homo sapiens Wilms tumor 1 associated protein (WTAP)	-2,09	-1,28	-3,51	-2,16
NM_153186	Homo sapiens ankyrin repeat domain 15 (ANKRD15)	1,21	3,37	-1,1	-1,02
NM_153341	Homo sapiens IBR domain containing 3 (IBRDC3)	-2,95	-1,37	-3,92	-1,12
NM_170587	Homo sapiens regulator of G-protein signalling 20 (RGS20)	-3,61	-1,24	-1,88	-1,84
NM_173198	Homo sapiens nuclear receptor subfamily 4	-10,78	-1,26	-4,87	-2,4
NM_173842	Homo sapiens interleukin 1 receptor antagonist (IL1RN)	-3,02	1,74	-4,23	-2,35
NM_174918	Homo sapiens mast cell-expressed membrane protein 1 (MCEMP1)	2,74	1,19	4,13	2,42
NM_175571	Homo sapiens GTPase	-3,25	-1,41	-4,28	-2,39
NM_181501	Homo sapiens integrin	-7,32	-1,17	-7,23	-3,01

NM_181597	Homo sapiens uridine phosphorylase 1 (UPP1)	-1,81	6,2	-2,55	-2,58
NM_182488	Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 12 (USP12)	-3,99	-1,44	-2,96	-1,58
NM_182985	Homo sapiens ring finger protein 36 (RNF36)	-3,41	1,06	-2,26	-1,77
NM_199461	Homo sapiens nanos homolog 1 (Drosophila) (NANOS1)	-3,37	-1,43	-2,24	-1,86
NM_201266	Homo sapiens neuropilin 2 (NRP2)	-4	-1,46	-3,03	-1,58
THC2279115	ALU8_HUMAN (P39195) Alu subfamily SX sequence contamination warning entry	-3,62	-1,24	-5,67	-1,91
THC2340539	Unknown	-4,07	-1,35	-1,5	-1,59
THC2373516	Q86UN3 (Q86UN3) Nogo-66 receptor homolog-1 (Nogo-66 receptor-related protein 2)	-1,04	3,49	-2,67	1,4

ANEXO 6

Perfil transcriptómico celular específico de la infección por la cepa 5

ProbeID	Description	CEPAS DE <i>M. tuberculosis</i>				
		H37Rv	Beijing 7	Beijing 4	Beijing 5	
Nivel de expresión génica en THP-1 respecto a controles sin infectar						
A_23_P347100	Unknown	4,28	2,6	3,19	1,39	
A_24_P92973	Unknown	2,81	1,76	2,03	1,49	
A_32_P119165	Unknown	-2,22	-1,55	-3,44	-1,5	
AF110908	Homo sapiens TNF-receptor associated factor-3 (TRAF-3) mRNA, partial cds; and 3'UTR. [AF110908]	-1,67	-1,67	-3,27	-1,5	
AK074166	Homo sapiens mRNA for FLJ00239 protein. [AK074166]	-7,03	-1,66	2,21	-1,36	
BC043212	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5295205	4,72	2,1	1,76	1,24	
ENST00000299502	full-length cDNA clone CS0DH002YJ05 of T cells (Jurkat cell line) of Homo sapiens (human). [CR599277]	-8,51	2,47	4,32	1,26	
ENST00000355710	Human papillary thyroid carcinoma-encoded protein mRNA	1,75	3,44	3,05	1,31	
ENST00000368804	full-length cDNA clone CS0DI027YJ05 of Placenta Cot 25-normalized of Homo sapiens (human). [CR602107]	-3,64	-1,8	-1,64	-1,42	
NM_000837	Homo sapiens glutamate receptor	-2,65	-1,56	-5,19	1,12	
NM_000954	Homo sapiens prostaglandin D2 synthase 21kDa (brain) (PTGDS)	-3,48	-2,19	-1,52	-1,28	
NM_001001330	Homo sapiens receptor accessory protein 3 (REEP3)	1,54	1,97	3,55	1,18	
NM_001001438	Homo sapiens lanosterol synthase (2)	-3,14	-1,67	-2,64	-1,38	
NM_001017995	Homo sapiens SH3 and PX domains 2B (SH3PXD2B)	-3,01	-1,57	-6,13	-1,38	
NM_001040440	Homo sapiens coiled-coil domain containing 112 (CCDC112)	2,19	1,74	3,6	1,43	
NM_001465	Homo sapiens FYN binding protein (FYB-120/130) (FYB)	-2,57	-1,61	3,78	-1,11	
NM_001552	Homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 4 (IGFBP4)	-2,77	1,13	-4,52	2,06	
NM_001568	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3	3,74	1,97	2,04	1,05	
NM_001665	Homo sapiens ras homolog gene family	-1,69	-1,63	-3,99	-1,09	
NM_001764	Homo sapiens CD1b molecule (CD1B)	1,59	3,53	1,6	1,1	
NM_001766	Homo sapiens CD1d molecule (CD1D)	1,53	1,72	4,13	1,48	
NM_002139	Homo sapiens RNA binding motif protein	3,55	1,73	2,2	1,34	
NM_002183	Homo sapiens interleukin 3 receptor	-3,63	2,3	-3,34	-1,34	
NM_002224	Homo sapiens inositol 1	-4,1	-1,64	-2,75	-1,46	
NM_002421	Homo sapiens matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase) (MMP1)	-1,66	13,07	-1,88	-1,49	
NM_002445	Homo sapiens macrophage scavenger receptor 1 (MSR1)	2,62	9,92	3,87	1,45	
NM_002502	Homo sapiens nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100) (NFKB2)	-2,6	-1,53	-4,72	-1,05	
NM_002621	Homo sapiens complement factor properdin (CFP)	-3,98	-1,55	-1,62	-1,38	

NM_002638	Homo sapiens peptidase inhibitor 3	-3,31	-1,73	-2	-1,37
NM_002847	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase	3,64	2,49	3,94	1,35
NM_002927	Homo sapiens regulator of G-protein signalling 13 (RGS13)	3,36	4,1	2,22	1,42
NM_004350	Homo sapiens runt-related transcription factor 3 (RUNX3)	-1,54	-1,89	-4,2	-1,36
NM_004447	Homo sapiens epidermal growth factor receptor pathway substrate 8 (EPS8)	2,49	1,7	3,81	1,46
NM_004864	Homo sapiens growth differentiation factor 15 (GDF15)	1,8	5,83	-1,9	1,02
NM_004987	Homo sapiens LIM and senescent cell antigen-like domains 1 (LIMS1)	3,59	5,76	2,39	1,17
NM_005187	Homo sapiens core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2; translocated to, 3 (CBFA2T3), transcript variant 1, mRNA [NM_005187]	2,15	1,59	3,56	1,4
NM_005397	Homo sapiens podocalyxin-like (PODXL)	3,38	3,34	2,06	1,33
NM_005767	Homo sapiens purinergic receptor P2Y 3	3	3,59	2,48	1,36
NM_005980	Homo sapiens S100 calcium binding protein P (S100P)	-3,6	1,51	1,89	-1,43
NM_006495	Homo sapiens ecotropic viral integration site 2B (EVI2B)	4,16	2,24	3,35	1,38
NM_006598	Homo sapiens solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters)	2,06	1,85	4,66	1,37
NM_014640	Homo sapiens tubulin tyrosine ligase-like family	-1,57	-2,23	-3,23	-1,28
NM_014897	Homo sapiens zinc finger protein 652 (ZNF652)	1,7	1,94	3,82	1,07
NM_016354	Homo sapiens solute carrier organic anion transporter family	-1,63	3,34	-2,92	-1,49
NM_017831	Homo sapiens ring finger protein 125 (RNF125)	2,45	2,99	6,25	1,4
NM_017918	Homo sapiens coiled-coil domain containing 109B (CCDC109B)	3,06	3,05	5,33	1,18
NM_018381	Homo sapiens hypothetical protein FLJ11286 (FLJ11286)	-3,25	-1,7	-1,59	-1,42
NM_018993	Homo sapiens Ras and Rab interactor 2 (RIN2)	1,97	3,81	2,48	1,33
NM_020152	Homo sapiens chromosome 21 open reading frame 7 (C21orf7)	3,61	5,64	2,68	1,45
NM_020379	Homo sapiens mannosidase	3,19	2,84	4,61	1,43
NM_020524	Homo sapiens pre-B-cell leukemia transcription factor interacting protein 1 (PBXIP1)	-3,52	-1,94	-2,27	-1,09
NM_020686	Homo sapiens 4-aminobutyrate aminotransferase (ABAT)	2,92	1,63	4,16	1,43
NM_020895	Homo sapiens GRAM domain containing 1A (GRAMD1A)	-4,39	-2,3	-6,68	1,05
NM_021202	Homo sapiens tumor protein p53 inducible nuclear protein 2 (TP53INP2)	-4,27	-1,82	-4,08	-1,4
NM_024617	Homo sapiens zinc finger	3,06	5,31	1,58	1,5
NM_030964	Homo sapiens sprouty homolog 4 (Drosophila) (SPRY4)	-1,91	3,49	-2,99	-1,3
NM_032467	Homo sapiens aspartate beta-hydroxylase (ASPH)	2,64	3,51	2,02	1,17
NM_032514	Homo sapiens microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (MAP1LC3A)	-3,82	-2,41	-5,49	-1,26
NM_032547	Homo sapiens short coiled-coil protein (SCOC)	4,04	2,18	2,21	1,22
NM_052868	Homo sapiens immunoglobulin superfamily	-3,13	-1,88	-5,22	-1,19
NM_053056	Homo sapiens cyclin D1 (CCND1)	1,59	4,51	-2,95	-1,49

NM_080651	Homo sapiens thyroid hormone receptor associated protein 6 (THRAP6)	1,73	2,47	3	1,05
NM_139181	Homo sapiens centaurin	-2,04	-1,52	-3,38	-1,43
NM_153611	Homo sapiens cytochrome b	-1,64	-3,17	-4,64	-1,25
NM_173216	Homo sapiens ST6 beta-galactosamide alpha-2	2,12	2,33	3,97	1,17
NM_198232	Homo sapiens ribonuclease	-1,7	1,67	4,5	1,48
NM_201553	Homo sapiens fibrinogen-like 1 (FGL1)	2,09	2,13	6,18	1,41
NM_203391	Homo sapiens glycerol kinase (GK)	-3,22	-1,67	-1,8	-1,42
NM_207380	Homo sapiens FLJ43339 protein (FLJ43339)	1,95	1,99	4,45	1,44
THC2282321	AF235005 suppression of tumorigenicity 16 protein {Homo sapiens;} , partial (13%) [THC2282321]	1,56	3,6	1,58	1,46
THC2445939	Q96HL9 (Q96HL9) CHP protein	3,66	2,81	2,54	1,3
XM_934407	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC647131 (LOC647131)	1,59	4,27	2,31	-1,05