

**GENOTIPIFICACION DE *Mycobacterium tuberculosis* EN AISLADOS
CLÍNICOS OBTENIDOS DE PACIENTES VIH POSITIVOS DE LOS
HOSPITALES SIMON BOLÍVAR Y SANTA CLARA DE BOGOTÁ**

MAGDA YOANA BELTRÁN LEÓN

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN INFECCIONES Y SALUD EN EL TRÓPICO
BOGOTÁ D.C.
2016**

**GENOTIPIFICACION DE *Mycobacterium tuberculosis* EN AISLADOS
CLÍNICOS OBTENIDOS DE PACIENTES VIH POSITIVOS DE LOS
HOSPITALES SIMON BOLÍVAR Y SANTA CLARA DE BOGOTÁ**

MAGDA YOANA BELTRÁN LEÓN

**Proyecto de grado para optar al título de
Magister Scientiae en Infecciones y Salud en el Trópico**

Directora:

Dra. Martha Isabel Murcia Aranguren MSc. PhD.

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN INFECCIONES Y SALUD EN EL TRÓPICO
BOGOTÁ D.C.
2016**

RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades infecciosas de más amplia distribución en el mundo y constituye una de las primeras causas de muerte en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). En Colombia, se ha observado un aumento creciente en el número de casos de pacientes VIH coinfectados con TB, Sindemia que aumenta la gravedad de los dos cuadros, acelerando el deterioro inmunológico y por tanto contribuyendo a la morbilidad y mortalidad de la población coinfectada.

Se estudiaron 356 pacientes VIH positivos atendidos en los Hospitales Simón Bolívar y Santa Clara de la ciudad de Bogotá, con el fin de detectar la asociación TB/VIH, de los cuales 36 (10,1%) fueron diagnosticados con TB por cultivo, obteniéndose 49 aislados de *Mycobacterium tuberculosis* que fueron genotipificados en este estudio, mediante las técnicas de Spoligotyping y MIRU VNTR de 24 loci.

El total de los aislados de complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) fueron evaluados por el método fenotípico BACTEC MGIT™ SIRE™ y el método molecular Genotype® MTBDRplus 2.0 para detectar resistencia a medicamentos anti-tuberculosis. Por el método fenotípico se detectó 1/49 (2%) monorresistencia a rifampicina y 2/49 (4%) monorresistencias a Isoniazida, mientras que, por el método molecular, el 100% de los aislados fueron sensible a Isoniazida y 3/49 (5,9%) monorresistentes a rifampicina.

Por Spoligotyping se identificaron en total 15 patrones espoligo, de los cuales 3 fueron huérfanos. Del total de aislados estudiados, 45/49 (91,8%), pertenecen al linaje Euro Americano y de estos el 55% (27/45) pertenecen al sub-linaje Haarlem, 22% (11/45) al sub-linaje LAM y el 14% (7/45) al sub-linaje T. Por la técnica MIRU-VNTR, se obtuvo que del total de aislados de *M. tuberculosis* estudiados, 26/49 (53%) se agruparon 11 clusters y 24/49 (49%) tuvieron patrones únicos. Adicionalmente, se pudo evidenciar infección policlonal en 3 pacientes. De las dos técnicas utilizadas, el poder discriminatorio de MIRU-VNTR (0,984) fue mayor que el del spoligotyping (0,888).

Con los resultados obtenidos en este estudio, se genera conocimiento valioso sobre los genotipos de *M. tuberculosis* circulantes en Bogotá, específicamente en la población VIH/SIDA, que permite entender la dinámica de transmisión de la TB en esta población vulnerable.

PALABRAS CLAVE: Asociación TB/VIH, Colombia, Genotipificación, Linajes, Epidemiología Molecular, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), Tuberculosis, Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease with a worldwide distribution and is one of the leading causes of death in patients with Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). In Colombia, the number of HIV patients co-infected with TB has been increases progressively, this syndemic rises the severity of the two diseases, accelerating the immune deterioration and thus contributing to the morbidity and mortality of the co-infected population.

In this study, 356 HIV-positive patients were treated in Simon Bolivar and Santa Clara hospitals of Bogota, in order to determine the TB/HIV partnership. A total of 49 isolates of *Mycobacterium tuberculosis* were genotyped by spoligotyping and MIRU VNTR loci 24.

First line drug susceptibility testing was performed using BACTEC MGIT™ SIRE™ and Genotype® MTBDR*plus* 2.0. Susceptibility determination of 49 *M. tuberculosis* clinical isolates by BACTEC MGIT™ SIRE™ showed 1/49 (2%) was monoresistance to RIF and 2/49 (4%) were monoresistance to INH. While by Genotype® MTBDR*plus* 2.0, all isolates were susceptible to INH and 3/49 (5,9%) were monoresistance to RPM.

Spoligotype analysis showed 15 patterns, of which 3/49 (6,1%) were orphans and 45/49 (91,8%) belonged to the Euro American lineage. From these patterns, 55% (27/45) belonged to Haarlem sub-lineage, 22% (11/45) to LAM sub-lineage, and 14% (7/45) to T sub-lineage. MIRU-VNTR analysis showed 26/49 (53%) formed 11 clusters and 24/49 (49%) were unique patterns. The discriminatory power of 24-locus MIRU-VNTR typing (0.984) was greater than the Spoligotyping (0.888).

The results obtained in this study generates valuable knowledge on the circulating genotypes of *M. tuberculosis* in Colombia, specifically on HIV-AIDS population. This knowledge is useful for understanding the dynamics of TB transmission in this vulnerable population.

KEYWORDS: Association HIV/TB, Colombia, Genotyping, Bloodlines, Molecular Epidemiology, Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS), Tuberculosis, Human

AGRADECIMIENTOS

- * En primer lugar, doy gracias a Dios por permitirme llegar hasta aquí y acompañarme en cada paso, por darme fuerzas cada día para continuar y no dejarme desfallecer en los peores momentos.
- * A mi hijo Juan Andrés, por ser el motor de mi vida, el motivo para sacar adelante este trabajo y por alegrar mis días más grises.
- * A mi esposo por su amor, su apoyo incondicional y compañía desde siempre.
- * A mi mamá, mis hermanos y sobrinos por brindarme la mano, por su amor absoluto, por ser mi columna y estar siempre en los momentos cuando más los necesito.
- * A Samanta, Catherine, Madelosa, Dianas, Alba, Felipe, Carolina, Pepe, Kety, Sindy por su lealtad, consejos, ayuda y amistad.
- * A la Universidad Nacional de Colombia.
- * A la Maestría en Infecciones y Salud en el Trópico y el Departamento de Parasitología.
- * Al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina.
- * A la profesora Martha Murcia por su apoyo y múltiples enseñanzas.
- * Al profesor Ricardo Sánchez por su paciencia y ayuda
- * A mis compañeros del laboratorio de micobacterias, Saray, Liliana, Julio, Daniel, Nina, Juan, Iván, Irene y Francy por su compañía y apoyo.
- * A Claudia, Jefe Elizabeth, Jefe Natalia, Dra. Ana María, Dr. Bracho, Dr. Awad y Dr. Ordoñez de los programas de VIH y Tuberculosis del Hospital Santa Clara por su cariño, respeto y ayuda durante el proceso de toma de muestras.
- * A Luisa Fernanda y Alejandro por su gran colaboración desde el principio.
- * A mis pacientes por aceptar participar en el estudio y por regalarme un poquito de su historia y permitirme aprender de ellos.
- * Este proyecto fue financiado por COLCIENCIAS. Contrato Número. 696-2013.

En memoria a los pacientes que murieron durante este estudio

NOTA DE ACEPTACION

La presente tesis fue sustentada y aprobada para el grado de Maestría en Infecciones y Salud en el Trópico, el 31 de agosto de 2016.

En Constancia firman:

Jurado: Carlos Saavedra Trujillo, MD. MSc
Departamento de Infectología
Universidad Nacional de Colombia

Jurado: Myriam Navarrete Jiménez, MSc.
Departamento de Microbiología
Universidad Nacional de Colombia

Directora: Martha I. Murcia A., PhD MSc.
Departamento de Microbiología
Universidad Nacional de Colombia

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	15
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	17
3. OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GENERAL:.....	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4. MARCO TEÓRICO	20
4.1 EPIDEMIOLOGÍA.....	20
4.2 TUBERCULOSIS	22
4.3 AGENTE ETIOLÓGICO	23
4.4 SINDEMIA TB/VIH.....	24
4.5 FARMACORRESISTENCIA	27
4.6 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE LA TUBERCULOSIS.....	28
4.7 CARACTERIZACIÓN Y EVOLUCIÓN DE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	30
4.8 MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	35
4.8.1 <i>RFLP-IS6110. Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos Largos de Restricción (restriction fragment length polymorphism)</i>	36
4.8.2 <i>Spoligotyping (Spacer Oligotyping) “Espoligotipado”</i>	37
4.8.3 <i>MIRU-VNTR. Unidades Repetitivas Micobacterianas Interespaciadas - Número Variable de Repeticiones en Tándem (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units -Variable Number of Tandem DNA Repeats)</i>	39
5. METODOLOGÍA	42
5.1 TIPO DE ESTUDIO.....	42
5.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO	42
5.3 MUESTRA	42
5.4 VARIABLES DEL ESTUDIO	42
5.5 RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN	43
5.6 DISPOSICIONES ÉTICAS.....	43
5.7 RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.....	43
5.7.1. <i>Baciloscopia</i>	45
5.7.2. <i>Cultivo</i>	45
5.8 CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y EPIDEMIOLÓGICA DE LOS PACIENTES COINFECTADOS VIH-TB.	46
5.9 ANÁLISIS DE DATOS.....	46
5.10 MÉTODO BACTEC™ MGIT™ SIRE	47
5.11 GENO™TYPE® MTBDRPLUS 2.0.....	48
5.12 GENOTIPIFICACIÓN MOLECULAR POR SPOLIGOTYPING.....	52
5.13 GENOTIPIFICACIÓN MOLECULAR POR MIRU DE 24 LOCI.....	53
6. RESULTADOS	56
6.1 CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y EPIDEMIOLÓGICA DE LOS PACIENTES.	56
6.2 PATRONES DE SUSCEPTIBILIDAD A MEDICAMENTOS ANTITUBERCULOSOS DE PRIMERA LÍNEA EN LOS AISLADOS CLÍNICOS DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> OBTENIDOS	63
6.3 GENOTIPIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> POR SPOLIGOTYPING	63
6.4 GENOTIPIFICACIÓN DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> USANDO LA METODOLOGÍA MIRU-VNTR	67
6.4.1 <i>Estandarización de la PCR de acuerdo a las condiciones del laboratorio.</i>	67

6.4.2	<i>Determinación de patrones únicos y agrupados Mycobacterium tuberculosis por MIRU-VNTR</i>	73
6.4.3	<i>Determinación de frecuencia alélica de los MIRU-VNTR</i>	75
6.4.4	<i>Comparación entre los poderes discriminatorios de las metodologías de Tipificación utilizadas en el estudio</i>	76
6.5	GENOTIPIFICACIÓN DE LOS AISLADOS DE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> POR SPOLIGOTYPING Y MIRU-VNTR	77
6.6	ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ESTADÍSTICA ENTRE LAS CEPAS AGRUPADAS Y LA POBLACIÓN EN ESTUDIO.....	80
7.	DISCUSIÓN	81
8.	CONCLUSIONES	85
	DIFUSIÓN Y DIVULGACIÓN DE RESULTADOS	86
	BIBLIOGRAFIA	87
	ANEXOS	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Filogenia del genoma completo de 220 cepas de CMT	32
Figura 2.	Distribución Geográfica de los Linajes del CMT	34
Figura 3.	Filogeografía de los principales sublinajes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	35
Figura 4.	DRs y espaciadores utilizados en Spoligotyping	37
Figura 5.	Posición de 41 loci MIRU en el cromosoma de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	40
Figura 6.	Cromosoma de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> de la cepa hipotética X	41
Figura 7.	Flujograma para la obtención de aislados de <i>M. tuberculosis</i>	44
Figura 8.	Lectura de las tiras de GenoType® MTBDRplus 2.0	50
Figura 9.	Edad de los pacientes infectados con TB	57
Figura 10.	Servicios de hospitalización donde se captaron los pacientes	57
Figura 11.	Lugar de nacimiento de los pacientes	58
Figura 12.	Sustancias psicoactivas consumidas	58
Figura 13.	Frecuencia de coinfecciones en la población de estudio	60
Figura 14.	Síntomas presentes en los pacientes coinfectados VIH/TB	61
Figura 15.	Frecuencia de TB según fuente de aislamiento	61
Figura 16.	Membrana de spoligotyping	64
Figura 17.	Identificación de los patrones SIT obtenidos por spoligotyping	65
Figura 18.	Sublinajes (familias) de los aislados de <i>M. tuberculosis</i>	66
Figura 19.	Árbol de mínima expansión (MST) basada en los patrones de spoligotyping	67
Figura 20.	Amplificación de los loci MIRU 4, MIRU 26 y MIRU 40	68
Figura 21.	Amplificación de los loci MIRU 10, MIRU 16 y MIRU 31	69
Figura 22.	Amplificación de los loci VNTR 46, VNTR 48 y VNTR 49	69
Figura 23.	Amplificación de los loci MIRU 20, MIRU 24, MIRU 27, VNTR 42 y VNTR 43	70
Figura 24.	Amplificación de los loci VNTR 43, ETR A, QUB-11b y VNTR 1955	70
Figura 25.	Amplificación de los loci VNTR 47, VNTR 52 y VNTR 53	71
Figura 26.	Amplificación de los loci MIRU 2, MIRU 23 y MIRU 39	71
Figura 27.	Amplificación de los loci MIRU 27 y VNTR 42	72
Figura 28.	Infección policlonal detectada	72
Figura 29.	Identificación de los patrones MIT obtenidos por MIRU-VNTR	73
Figura 30.	Árbol de mínima expansión (MST) basado en los patrones de MIRU-VNTR	74
Figura 31.	Identificación de los patrones obtenidos por Spoligotyping y MIRU-VNTR	78
Figura 32.	Árbol de mínima expansión (MST) basados en spoligotyping y MIRU-VNTR de 24 loci	79

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Secuencias de los oligonucleótidos unidos a la membrana de nylon	38
Tabla 2.	Concentraciones de los antibióticos para BACTEC™ MGIT™ SIRE	48
Tabla 3.	Mutaciones en los genes <i>rpoB</i> , <i>katG</i> e <i>inhA</i> detectadas por GenoType® MTBDRplus 2.0	51
Tabla 4.	Mezcla maestra de PCR para amplificación de DR	52
Tabla 5.	Primers para amplificación de MIRU-VNTR 24 loci	55
Tabla 6.	Caracterización demográfica de los pacientes VIH positivos estudio	56
Tabla 7.	Características clínicas de los pacientes VIH positivos en estudio	59
Tabla 8.	Formas Clínicas de TB en los Pacientes VIH positivos en estudio	61
Tabla 9.	Monorresistencias y mutaciones en los aislados de <i>M. tuberculosis</i>	63
Tabla 10.	Frecuencia de SITs obtenidos	66
Tabla 11.	Frecuencia alélica de los MIRU-VNTR analizados	75
Tabla 12.	Comparación del poder discriminatorio entre Spoligotyping y MIRU-VNTR	76
Tabla 13.	Diversidad alélica usando HGDI para MIRU-VNTR 24 loci en 49 aislados de <i>M. tuberculosis</i> de pacientes VIH positivos	77
Tabla 14.	Asociación entre agrupamiento con variables demográficas y clínicas	80

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Encuesta aplicada a los pacientes	94
Anexo 2.	Consentimiento Informado	97
Anexo 3.	Hibridación de spoligotyping	100
Anexo 4.	Preparación de las mezclas de pcr para cada loci MIRU	102
Anexo 5.	Cuadro guía de variación alélica y genotipo de H37Rv/Ra	103
Anexo 6.	Cálculo índice discriminatorio de Hunter Gaston (HGDI)	104
Anexo 7.	Abstracts del Posters Presentado en el 36th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, June 28th To July 1st, 2015, Riga (Latvia)	105
Anexo 8.	Abstracts del Posters Presentado en el 37th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, July 3-July 6, 2016 Catania-Sicily (Italia)	106

SIGLAS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ART	Tratamiento antirretroviral
BAAR	Bacilos Acido Alcohol Resistentes.
BCG	Bacilo Calmette Guerin
BK	Baciloscopia
CAS	Central Asian
CMT	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DR	Repeticiones Directas
EAI	East African Indian
E	Etambutol
EPS	Entidad Promotora de Salud
ETR	Secuencias repetidas en serie exactos
ETS	Enfermedades de transmisión sexual.
HGDI	Índice Discriminatorio de Hunter & Gaston
H	Isoniazida
IMC	Índice de Masa Corporal
IS	Secuencias de inserción
LAM	Latinoamericano y Mediterráneo
LJ	Löwenstein–Jensen
LSPs	Polimorfismos de largas secuencias
MDR	Multidrogorresistente.
MIRU-VNTR	Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit/Variable Number of Tandem Repeats.
MIT	Código MIRU internacional
MPTR	Secuencias repetidas polimórficas principales en serie
MST	Minimum spanning trees
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud.
OPS	Organización Panamericana de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PM	Peso Molecular
PVVS	personas que conviven con el VIH/Sida
R	Rifampicina
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RR	Monorresistente a rifampicina
rRNA	RNA ribosomal
SGSSS	Sistema General de Seguridad Social de Colombia.
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.
SIRE	Streptomycin, Isoniazida, Rifampicina y Etambutol.
SIT	Código spoligo internacional
Sivigila	Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública
SNP	Polimorfismos de nucleótido único
SPA	Sustancias psicoactivas
SSR	Repeticiones de secuencias cortas
STG	Stonebrink modificado por Giraldo

S	Estreptomicina
TARGA	Terapia antirretroviral de gran actividad.
TB	Tuberculosis.
TbD1	Delección 1 específica de <i>M. tuberculosis</i>
UPGMA	Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana.
WT	Sonda tipo silvestre
XDR	Extensivamente resistente.

INTRODUCCIÓN

A pesar de los esfuerzos realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en los últimos años la tuberculosis (TB) continúa siendo el mayor problema global de salud pública en el mundo y es la segunda causa de muerte debida a un agente infeccioso después del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) (1, 2). De acuerdo a estimativos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2014 se presentaron 9.6 millones de casos nuevos de TB en el mundo, para una incidencia mundial de 133 casos por 100.000 habitantes, de los cuales 1,2 millones (12%) eran VIH positivos; se presentaron 1,5 millones de muertes, de las cuales 390.000 ocurrieron en individuos VIH positivos; 480.000 casos de tuberculosis multidrogorresistente (TB-MDR), sin embargo, solo fueron reportados 123.000 (1). Se estima que un 9,7% de las personas con TB-MDR tiene tuberculosis extensivamente resistente (TB-XDR). (1).

En la región de las Américas se estimaron 280.000 casos incidentes de TB, de los cuales 36.000 eran pacientes VIH positivos, 4.000 casos nuevos de TB-MDR y solo 3000 de ellos fueron tratados (1).

En Colombia cada año se diagnostican alrededor de 12.000 casos nuevos de TB. En el año 2015, se reportaron 12.918 casos y se notificaron 926 muertes a causa de este evento (3). En Bogotá D.C., para el año 2015 se notificaron 1.252 casos de TB (803 casos de TB pulmonar y 449 TB extrapulmonar) y las localidades de mayor notificación fueron Suba con 116 casos, Kennedy con 108 casos y Engativá con 91 casos. Para este año se reportó una coinfección VIH/TB del 24% (300 casos) (4).

Al igual que TB, el VIH/SIDA sigue siendo uno de los problemas de salud pública más graves del mundo, especialmente en los países de ingresos bajos o medios. Se estima que, a nivel mundial, 36,9 millones de personas estaban infectadas con el VIH a finales del 2014 (5). En Colombia, la infección por VIH aporta cada vez más casos al año, según datos reportados al Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila), desde 1985 hasta 2013 se notificaron 92.379 casos de VIH/SIDA, con una incidencia de 17,4 casos por 100.000 habitantes (6). Para diciembre de 2015 se notificaron 11.606 casos de VIH en el país y 783 muertes por la enfermedad (3).

La infección por VIH se considera el principal factor de riesgo para desarrollar TB y a su vez la TB es el principal marcador pronóstico de VIH y la enfermedad

oportunista más común asociada al VIH, lo cual potencia la morbilidad simultáneamente y hace que tengan un sinergismo mortal (7-10).

La genotipificación de *M. tuberculosis* mejora el enfoque de la epidemiología tradicional y juega un papel importante en el incremento de las estrategias de control de la TB, ya que contribuye al conocimiento de las rutas de transmisión, diferencia en el caso de recaídas si se trata de una reinfección exógena o una reactivación endógena, también diferencia transmisión reciente de reactivación e identifica la presencia de brotes. En la actualidad se utilizan dos métodos de genotipificación de *M. tuberculosis* basados en PCR: MIRU-VNTR (Mycobacteria Intergenic Repetitive Units - Variable Number Tandem Repeats) - Unidades Repetitivas Intergénicas de Micobacterias. Unidades Variables Repetidas en Tandem y Spoligotyping (spacer oligotyping). MIRU-VNTR se basa en el número variable de secuencias repetidas en tandem (VNTR), que conforman elementos genéticos denominados unidades repetitivas intergénicas de micobacterias (MIRU), mientras que el spoligotyping permite hallar el polimorfismo encontrado en el locus DR del cromosoma bacteriano (11).

El objetivo general de este estudio fue caracterizar genotípicamente aislados clínicos de *M. tuberculosis* obtenidos de pacientes VIH positivos de los Hospitales Simón Bolívar y Santa Clara de Bogotá, obtenidos en el periodo comprendido entre octubre de 2014 y noviembre de 2015. La información generada en este estudio permitió reconocer los linajes/sublinajes circulantes de *M. tuberculosis* en pacientes VIH positivos coinfectados con TB en Bogotá.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa causada en más del 95% de los casos por *Mycobacterium tuberculosis* (12), afecta la mayoría de veces los pulmones, se transmite persona a persona a través del aire, es curable y se puede prevenir. Más del 95% de los casos y las muertes se registran en los países en desarrollo, donde el riesgo de contraer la enfermedad se da en todos los grupos de edad pero afecta principalmente a los adultos jóvenes, es decir, en la edad más productiva (2).

Un tercio de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis* y cada año se enferman en el mundo alrededor de 9 millones de personas, de las cuales mueren aproximadamente 2 millones, considerándose como una de las primeras causas de muerte en países con alta prevalencia de TB (1).

El aumento de la epidemia de VIH en todo el mundo fue la principal causa para que la TB aumentara en países desarrollados que habían conseguido disminuir su prevalencia, así como en países en vía de desarrollo, en los que la coinfección TB/VIH es común, ya que pueden estar asociadas al hacinamiento, pobreza y a escasos recursos para el diagnóstico, el tratamiento y el control de las enfermedades (10). La coinfección TB/VIH aumenta el riesgo de muerte prematura y empeora la calidad de vida de los pacientes, lo cual en Colombia se convierte en una importante carga para el Sistema General de Seguridad Social en Salud (SGSSS), principalmente por la mortalidad asociada (10).

La composición filogeográfica de la población de *M. tuberculosis* muestra una fuerte asociación entre linajes y la población humana, que pueden estar implicados en el desarrollo de las estrategias de control de la enfermedad (13). Con el uso de herramientas brindadas por la Epidemiología Molecular se han realizado estudios de transmisión global de la enfermedad, que han permitido caracterizar brotes, diferenciar entre transmisiones recientes o antiguas, detectar si hay contaminación cruzada en el laboratorio, detección de reinfección o recaída en pacientes con episodios secundarios de TB e identificación de poblaciones con alto riesgo de transmisión, con el fin de implementar la estrategia de control adecuada para contrarrestar la transmisión (14).

Es claro que hay una asociación entre linajes y regiones geográficas. En la actualidad se han descrito 7 grandes linajes en *M. tuberculosis*, los cuales difieren

en pequeños cambios nucleotídicos entre ellos y se localizan en lugares geográficos específicos, agrupándose en linajes “ancestrales” y “modernos” (15, 16). Algunos estudios se han realizado para determinar si el fenotipo de la enfermedad (TB pulmonar o extrapulmonar) depende del linaje de la cepa responsable de la infección, sin embargo, no se ha evidenciado una clara relación al respecto y los resultados difieren entre ellos (17-22). Otros estudios se han centrado en perfiles de "virulencia" y han detectado patrones comunes que muestran que los linajes "modernos" son generalmente más virulentos y tienen mayor éxito de dispersión a nivel mundial, en comparación con otros linajes geográficamente más restringidos. Las diferencias en cuanto a inmunogenicidad, gravedad de la enfermedad, y transmisión, indican consistentemente que los linajes 2 y 4 son más virulentos que los linajes 1 y 6 (22). Muchos estudios han demostrado un aumento en la aparición del Linaje 2/Beijing a través del tiempo, el cual podría estar causado por tratamiento antibiótico (23) o vacunación con la vacuna BCG (24, 25).

En Colombia existe un gran desconocimiento sobre los genotipos circulantes de *M. tuberculosis* y son muy pocos los estudios que lo documentan. Los estudios realizados reportan una alta prevalencia del linaje 4 y se ha podido evidenciar diferencias entre los sublinajes dependiendo de la población. En Bogotá el sub linaje LAM (49,3%) fue el más prevalente (26); en Medellín, fue Haarlem (48,7%); en Cali LAM y Haarlem tuvieron la misma prevalencia (39%) y en Cauca, fue T (40%) (13), adicionalmente, se han reportado casos del linaje Beijing encontrado en pacientes provenientes de Buenaventura (13, 26-28). Sin embargo, hasta ahora hay regiones del país en donde esta información es totalmente desconocida.

Adicionalmente, los estudios realizados en Colombia han evaluado los genotipos de *M. tuberculosis* en población general, pero ninguno ha sido realizado en población infectada con VIH. Teniendo en cuenta que el Linaje 4 tiene una alta virulencia, que es el más prevalente en el país y que los pacientes VIH positivos tienen una mayor vulnerabilidad a padecer TB y presentar complicaciones mucho más graves que la población VIH negativa, debido principalmente a su deficiencia inmunológica, es de gran importancia conocer a que genotipos de *M. tuberculosis* se están enfrentando los individuos VIH positivos, para así poder aplicar el tratamiento correcto, proponer estrategias para el control de la enfermedad y evaluar la eficacia de las mismas en este grupo poblacional, así como evaluar la dinámica de transmisión de la TB, recaída y reinfección.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar genotípicamente aislados de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidos de pacientes VIH positivos atendidos en los Hospitales Simón Bolívar y Santa Clara de Bogotá, durante octubre de 2014 a noviembre de 2015.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar clínica y epidemiológicamente los pacientes VIH coinfectados con tuberculosis.
2. Identificar los patrones de susceptibilidad a medicamentos antituberculosos de primera línea en los aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidos.
3. Determinar los genotipos circulantes de *Mycobacterium tuberculosis* aislados de pacientes VIH positivos de los Hospitales Simón Bolívar y Santa Clara de Bogotá, mediante la técnica de Spoligotyping.
4. Determinar los genotipos circulantes de *Mycobacterium tuberculosis* aislados de pacientes VIH positivos de los Hospitales Simón Bolívar y Santa Clara de Bogotá, mediante la técnica MIRU-VNTR de 24 loci.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 EPIDEMIOLOGÍA

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades infecciosas de más amplia distribución en el mundo y constituye una de las primeras causas de muerte en pacientes con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), especialmente en países en vías de desarrollo como Colombia. Un tercio de la población mundial está infectada con el *Mycobacterium tuberculosis*, cada año se enferman cerca de 8 millones de personas, de las cuales mueren dos millones, aproximadamente (8) y es una de las primeras causas de muerte en países con alta prevalencia de esta enfermedad (29). Aproximadamente unos 14 millones de personas presentan coinfección TB/VIH alrededor del mundo, siendo la TB la principal causa de muerte en pacientes con VIH (30). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que, en 2014, se presentaron en el mundo 9,6 millones de casos nuevos de TB. Las regiones con mayor número de casos fueron: Asia con el 58% y África con el 28%. Los países con más casos fueron India (23%), Indonesia (10%) y China (10%). Las regiones que tuvieron el menor número de casos fueron: la región del Mediterráneo Oriental (8%), Europa (3%) y la región de las Américas (3%) (1).

De los 9,6 millones de casos de TB incidentes en el 2014, entre 1,1 y 1,3 millones (11% - 13%) se presentaron en personas VIH positivas, con una mejor estimado de 1,2 millones (12%). La mayor proporción de casos de TB coinfectados con VIH se presentó en la región de África con un 32% de casos. Durante el 2014 hubo un estimado de 1,5 millones de muertes por TB, de las cuales 1,1 millones se presentaron en personas VIH negativas (16 muertes por 100.000 habitantes), y 390.000 entre las personas VIH positivas (21 muertes por 100.000 habitantes). A nivel mundial, se estimó que el 3,3% de casos nuevos de TB y 20% de casos previamente tratados tuvieron TB-MDR, las cuales cobraron alrededor de 190.000 vidas. En el 2014 hubo un aumento considerable en la realización de las pruebas de susceptibilidad a medicamentos anti-TB con respecto a los años anteriores. 58% de pacientes tratados y 12% de nuevos casos fueron evaluados. Probablemente debido a la inclusión de las pruebas moleculares. Del total estimado de casos nuevos de TB-MDR (480.000 casos), únicamente 123.000 (41%) fueron detectados y reportados. El inicio del tratamiento tuvo un incremento del 14% con respecto al 2013. Sin embargo, solo el 50% de pacientes fueron exitosamente tratados. Los casos de TB-XDR se reportaron en 105 países. Se estima que un 9,7% de las personas con TB-MDR tiene TB-XDR (1).

En la Región de las Américas se estimó que en el año 2011 se presentaron unos 268.400 casos de TB, 5.100 menos que en el 2010. Alrededor de dos tercios (67%) de todos los casos nuevos de TB ocurrieron en América del Sur (subregión andina: 29%; México y Centroamérica 17%; en el Caribe 11%, y en América del Norte 5,1%). La tasa de nuevos casos de TB en la región fue de 28 por 100.000 habitantes, de los cuales el 66% de todos los casos nuevos de TB que se registraron en la Región de las Américas correspondieron a Brasil, Perú, México, Haití y Colombia. El valor más alto correspondió al Caribe (75 casos por 100.000 habitantes) y el más bajo a América del Norte (3,9 casos por 100.000 habitantes). A nivel de los países, Haití es el país que presenta la mayor tasa de incidencia (222 casos por 100.000 habitantes), seguido por Bolivia (131 casos por 100.000 habitantes), Guyana (111 casos por 100.000 habitantes) y Perú (101 casos por 100.000 habitantes) (31).

En las Américas en el 2013 se estimó que hubo 285.200 casos nuevos lo que equivale a una tasa de 29 casos por 100.000 habitantes con TB. La mayor incidencia se presentó en la región Caribe (70 casos por 100.000 habitantes), seguida por la región Andina (63 casos por 100.000 habitantes) (32, 33). Se estimó que 23.811 fueron casos recurrentes, con una mortalidad de 19.000 pacientes VIH negativos y 6.000 VIH positivos, 20.355 pacientes tenían coinfección TB/VIH, de los cuales 129.174 se desconocía si eran portadores de VIH. En cuanto a la TB-MDR , se estimó que se presentaron 34.785 casos, de los cuales 2.967 fueron confirmados por el laboratorio (2).

En Colombia hasta diciembre de 2015 se notificaron 12.918 casos de TB, el 90.2% (11.647 casos) correspondieron a casos nuevos, y el 9.7% (1.257 casos) a casos previamente tratados, 14 (0,1%) de los casos no presentan datos complementarios. La incidencia acumulada calculada fue de 24,2 casos por 100.000 habitantes. El 81,4% (10.519 casos) correspondió a TB pulmonar y el 18,4% (2.385 casos) a TB extrapulmonar, siendo la TB pleural la forma que presentó el mayor número de casos (863 casos) con un 36,2%, seguida por la TB meníngea (439 casos) con un 18,4% y la TB ganglionar (392 casos) con un 16,4% (3). El mayor número de casos se presentó en hombres mayores de 15 años de edad (7.062), siendo los hombres mayores de 65 años los más afectados. En 2014 bacteriológicamente se confirmaron 187 casos de TB mono-resistente a rifampicina (RR)/MDR con un porcentaje estimado del 52% (1).

Con respecto a la coinfección TB/VIH, se estimó que para el año 2013 se presentaron 31.800 casos nuevos en las Américas, correspondientes al 11% de todos los casos nuevos de TB. Más de la mitad de los nuevos casos de TB

ocurrieron en Brasil y Haití en pacientes VIH positivos. La prevalencia estimada de coinfección por el VIH varió entre regiones, siendo la más baja en Norte América (6,6%) y la más alta en el Caribe (21%) (32).

En general, la coinfección TB/VIH ha ido aumentando progresivamente, en el 2006 había 131 casos de coinfección TB/VIH-SIDA, siendo la TB la enfermedad oportunista más reportada y la segunda causa de mortalidad (22%), en las personas VIH-SIDA en Colombia (7). Para el 2014 la coinfección TB/VIH fue de 3.400 casos y se presentaron 400 muertes con un tasa de incidencia de 0,84 por 100.000 habitantes (1).

4.2 TUBERCULOSIS

La tuberculosis (TB) es una enfermedad antigua, pero no es una enfermedad del pasado. La historia sugiere que la TB apareció hace aproximadamente 70.000 años, se convirtió en epidemia durante la revolución industrial por la densidad de población y las desfavorables condiciones de vida. Durante el siglo XX su incidencia disminuyó rápidamente en países desarrollados, gracias a que sus condiciones de vida mejoraron, además de la introducción de la vacuna BCG (Bacilo Calmette-Guerin) en 1921 y la aparición de los primeros medicamentos antituberculosos, tales como la esptreptomicina (1943), isoniazida (1952) y rifampicina (1963) (34). Después de desaparecer de la agenda mundial de salud pública entre los años 1960 y 1970, la TB regresó a principios de 1990 por varias razones, entre ellas, la aparición de la pandemia del VIH/SIDA, el aumento de la resistencia a los medicamentos y la desorganización de los programas de control con recursos económicos limitados. Esto contribuyó a que la TB volviera a ser reconocida como un problema de salud pública en todo el mundo y en 1993 fue declarada por la OMS como una emergencia mundial, para ese año la TB era la primera causa de muerte por un solo agente infeccioso (35).

La TB es una enfermedad infectocontagiosa causada en más del 95% de los casos por *Mycobacterium tuberculosis* (12), afecta la mayoría de veces los pulmones, se transmite persona a persona a través del aire, es curable y se puede prevenir (2). La infección con *M. tuberculosis* ocurre cuando pequeñas gotas infecciosas (aprox. 10–30 mm) son inhaladas por un individuo susceptible. Las gotas pueden contener hasta 300 bacilos y quedan suspendidas en el aire por algunas horas, de manera que el riesgo de infección no se limita a un contacto cercano o directo con un paciente con TB (36), esta transmisión se lleva a cabo cuando un enfermo con TB

pulmonar tose, estornuda, canta, habla o escupe, basta con que una persona inhale unos pocos bacilos para resultar infectada (2). El éxito de la infección y el desarrollo de la forma pulmonar de TB depende de cuatro pasos principales: (i) Fagocitosis del bacilo; (ii) Multiplicación intracelular del bacilo; (iii) Fase de latencia y (iv) Infección activa pulmonar. Estos pasos pueden progresar hacia diferentes manifestaciones clínicas: cura espontánea, enfermedad, infección latente y reactivación o reinfección; siendo las personas inmunosuprimidas quienes tienen mayor riesgo de desarrollar TB activa una vez infectados, especialmente pacientes en la fase SIDA (34).

En la mayoría de los casos el mayor riesgo de infección con *M. tuberculosis* depende de factores exógenos, tales como: (i) la epidemiología de TB en una región determinada, (ii) el ambiente social y (iii) la calidad en los sistemas de salud. Sin embargo, la probabilidad de desarrollar enfermedad activa es principalmente determinada por factores endógenos tales como: el estado nutricional, la salud general e inmunocompetencia que son determinantes críticos para el desarrollo de la infección. La mayoría de personas infectadas (aprox. 90%) no desarrollarán TB activa a lo largo de su vida y los bacilos se confinan en un microambiente inmunológico llamado "Granuloma". Sin embargo, pueden sobrevivir y persistir durante toda la vida del hospedero en un "estado de dormancia", lo que plantea una amenaza continua para el individuo infectado. Cualquier compromiso que afecte el sistema inmunológico tales como terapia inmunosupresora, infección por VIH, o edad avanzada, reaniman los bacilos latentes, causando la reactivación de la TB, la cual es clínicamente indistinguible de una infección primaria (36).

La TB primaria es encontrada predominantemente en niños menores de 4 años, que parecen tener un déficit en el control de *M. tuberculosis* y la reactivación de TB es encontrada en adultos que adquirieron el bacilo muchos años antes. Esta forma de TB es localizada en más del 80% en el pulmón, aunque otros órganos pueden también ser afectados (36).

4.3 AGENTE ETIOLÓGICO

Mycobacterium tuberculosis, se incluye taxonómicamente en el orden *Actinomycetales* y en la familia *Mycobacteriaceae*. Fue descubierto en 1882 por Robert Koch; es el agente etiológico de la TB en humanos y aunque su principal blanco es el pulmón, puede afectar cualquier órgano. Es una bacteria intracelular

obligada, ácido-alcohol resistente, de lento crecimiento (tiempo de generación de 15 a 20 horas), aerobia estricta, no móvil, no encapsulada, no forma esporas y las características de su pared muy rica en lípidos (30- 60% de su peso seco) le brinda protección y le confieren gran virulencia (37, 38). *M. tuberculosis* forma parte del denominado “complejo *Mycobacterium tuberculosis*” (CMT). Este complejo incluye varios miembros con secuencias de nucleótidos casi idénticas y secuencias de rARN 16s totalmente idénticas, demostrando que todos ellos tienen un ancestro común. Sin embargo, ellas difieren en términos del tropismo del hospedero, fenotipos y patogenicidad. El CMT incluye: *M. africanum*, este es un grupo heterogéneo de cepas responsables de la TB humana en África Ecuatorial y también infecta a primates, ganado y cerdos (34, 39); *M. canettii*, está estrechamente relacionada con *M. tuberculosis*, cuyos casos de enfermedad en humanos han sido reportados en África Oriental (40); *M. microti*, encontrada en roedores de campo, musarañas y recientemente en gatos en el Reino Unido (41), además fue aislada en un niño en Somalia en 1997 (42); *M. pinnipedii*, infecta focas y leones marinos; *M. caprae*, inicialmente aislada de cabras (43), infecta ovejas y se han encontrado también causando infección en venados (44); *M. bovis*, es el agente causal de la TB bovina que infecta a un amplio rango de hospederos domésticos y salvajes, particularmente en tejones que a su vez transmiten TB al ganado por mordedura (45). De esta especie se derivó el bacilo Calmette-Guérin (BCG), éste es la cepa vacunal. *M. orygis*, fue aislado de órices, gacelas, osos, venados, búfalos y también se ha encontrado en humanos en oriente y suroriente de Asia (46, 47). Más recientemente se describió *M. mungi* en una población de mangostas en Botsuana y *M. suricattae* en suricatas en Sur África (48). Por último, el Bacilo chimpanzee, se aisló una nueva cepa de chimpancés silvestres en Costa de Marfil (49). El bacilo dassie, es una infrecuente variante del CMT, más parecido al *M. microti* y es el agente causal de TB en el dassie (*Proavia capensis*) y nunca se han documentado infecciones en humanos (50).

4.4 SINDEMIA TB/VIH

La enfermedad causada por el VIH comenzó a cobrar vidas humanas a finales de la década de los 80s y se declaró como pandemia durante los 90s. Hasta ahora, el VIH/SIDA sigue siendo uno de los más graves problemas de salud pública del mundo, especialmente en los países de ingresos bajos o medios. Se estima que para finales del 2014, 36,9 (34,3–41,4 millones) de personas estaban infectadas con el VIH y se calcula que en ese mismo año murieron de SIDA alrededor de 1,2 (980.000-1,6 millones) millones de personas (5). La OMS estimó que en 2014 se

infectaron unos 2 (1.9–2.2) millones de personas y para mediados del 2015, 16 millones de personas estaban recibiendo tratamiento antirretroviral (ART). Se estima que unos 14 millones de personas en todo el mundo se encuentran doblemente infectadas. La TB es la principal causa de muerte en pacientes con SIDA, representando alrededor del 26% de las muertes relacionadas con este Síndrome, el 99% de los cuales ocurren en países en desarrollo (51).

Colombia ha sido clasificada como un país con una epidemia concentrada de VIH, pero su propagación varía de acuerdo al tipo de población. El grupo de edad con más casos notificados de VIH y SIDA es el de 20 a 39 años de edad y los grupos con mayor vulnerabilidad son los hombres que tienen relaciones sexuales con hombres, las mujeres transgénero, los habitantes de calle, los usuarios de drogas intravenosas, las mujeres trabajadoras sexuales y las personas privadas de la libertad, quienes presentan prevalencias de la infección superiores al 1%. En el país, la infección por VIH aumenta cada año, según datos reportados al Sivi, desde 1985 hasta 2013 se notificaron 92.379 casos de VIH/SIDA, con una incidencia de 17,4 casos por 100.000 habitantes incrementándose en el último año con 8.208 casos, afectando principalmente a la población masculina (6). En el 2015 fueron notificados 11.606 casos de VIH en el país y 783 muertes (3).

Sindemia es la convergencia de dos o más enfermedades que actúan sinérgicamente y magnifican su impacto. La coinfección VIH/TB, cumple con tal definición, contribuyendo notablemente a la morbilidad y mortalidad por TB en todo el mundo (52). La TB permite incrementar la replicación del VIH y acelera la progresión de la enfermedad (53). Los dos patógenos, se potencian entre sí, lo que acelera el deterioro de las funciones inmunológicas resultando en la muerte prematura si no se trata (30). Por un lado, el VIH aumenta hasta 37 veces el riesgo de desarrollar TB comparado con personas VIH negativas y, por otro lado, un individuo que ha sido diagnosticado con TB tiene 19 veces más riesgo de estar coinfectado con VIH que alguien sin TB (54, 55). La enfermedad por *M. tuberculosis* complica el SIDA al ser un patógeno virulento que lleva a la diseminación de los bacilos aumentando el porcentaje de pacientes con TB miliar, meníngea y extrapulmonar (56-58).

La coinfección con VIH es el mayor factor riesgo para la progresión de infección latente a TB activa y está asociado con el aumento del riesgo de infección *de novo* y reinfección, incluso antes de que aparezca la inmunosupresión severa (59). Estudios realizados en Estados Unidos indicaron que alrededor de dos tercios de aislados de *M. tuberculosis* aparecen en clusters, sugiriendo un incremento de

infecciones recientes. En India un país endémico de TB las recurrencias después del tratamiento se atribuyen a infección exógena en pacientes VIH positivos y la reactivación endógena a personas no infectadas con el VIH (30, 59).

El VIH y *M. tuberculosis* comparten reservorios anatómicos como el pulmón y se ha sugerido que pacientes con TB tienen un microambiente que facilita la infección por el VIH. De hecho, la TB activa ha sido asociada con la pérdida acelerada de linfocitos T CD4+ e incremento de infecciones oportunistas (60) y se ha observado que la activación de la respuesta inmune contra el bacilo aumenta la replicación del VIH-1 en la sangre (61) y en los sitios de infección por *M. tuberculosis* en los pulmones (30, 62). Los macrófagos alveolares son los actores principales en la defensa del hospedero, fagocitando el bacilo. En el sitio de la infección activa por *M. tuberculosis*, los macrófagos cargados de bacilos pueden también estar infectados con VIH. En 1995, Zhang Y. y col. encontraron que *M. tuberculosis* y especialmente el lipoarabinomano (LAM), su principal componente de la pared celular, fueron potentes inductores de la replicación del VIH. Probablemente, la estimulación pro inflamatoria de los macrófagos hace que estos liberen sustancias que favorecen la replicación del virus. Otro mecanismo por el cual *M. tuberculosis* podría aumentar la replicación de VIH es la coinfección de los macrófagos alveolares, contribuyendo así a la replicación del virus y del bacilo; a su vez, cuando estas células fagocíticas mueren, sus cuerpos apoptóticos con bacilos y viriones viables en su interior son fagocitados haciendo que otras células sean infectadas (63).

Las alteraciones en la respuesta inmune innata han sido bastante estudiadas, varios estudios se han enfocado en la capacidad que tienen los macrófagos para controlar el crecimiento y la muerte intracelular de *M. tuberculosis*. Sin embargo, este ha sido un tema muy controversial. Hay estudios que demuestran disminución de la habilidad del macrófago de pacientes infectados con VIH para controlar el crecimiento de *M. tuberculosis*, mientras que otros sugieren que tal efecto no existe (30).

En el país, son pocos los estudios existentes sobre la coinfección TB/VIH. Un estudio realizado en Cali en 1991, reportó una prevalencia de coinfección VIH/Micobacterias de 34,8%, de los cuales el 6,6% de los casos fueron ocasionados por *M. tuberculosis* (64). En 1996 Murcia MI. y col., reportaron una prevalencia de TB/VIH del 8% (65) y otro estudio realizado en Bogotá, entre 1999 y 2000, detectó el 1.4% (66). En el año 2006 la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá evaluó el panorama de la coinfección TB/VIH y encontró una coinfección del 11,9%, siendo el

género masculino el más afectado (92,2%) (67). En un estudio retrospectivo realizado en Armenia entre los años 2000 y 2010, donde se incluyeron 1.671 pacientes diagnosticados con TB, encontró que 113 casos tenían diagnóstico confirmado de VIH, para una prevalencia global de coinfección de 6,8%, con una tasa de letalidad del 39% (68).

El impacto de la inmunodeficiencia debida al VIH, es sin duda el mayor condicionante de la epidemiología mundial de la TB. Los estudios clínicos, epidemiológicos y moleculares dan cuenta de la sinergia existente entre estas dos patologías. Acciones como el inicio temprano de la terapia antiretroviral, la búsqueda activa de TB entre individuos VIH positivos y la adecuada utilización del conocimiento existente en cuanto a prevención, diagnóstico y tratamiento, con seguridad impactarán positivamente sobre la disminución de la carga de enfermedad (52, 69).

4.5 FARMACORRESISTENCIA

Las pruebas de susceptibilidad antimicobacterianas de primera línea incluyen: estreptomocina (S), isoniazida (H), rifampicina (R) y etambutol (E) y su importancia radica en que estos medicamentos actúen apropiadamente contra el bacilo causante de la enfermedad (susceptibilidad al medicamento) (70).

En las dos últimas décadas, la TB-MDR denominada así por su resistencia a R e H, principales medicamentos del esquema de primera línea, ha emergido en todo el mundo con una transmisión potencial antes insospechada. Los tratamientos inadecuados, mal absorción de los medicamentos debido a otras comorbilidades como el VIH y la poca adherencia del paciente, han ocasionado que la tasa de TB-MDR aumente en todo el mundo (71). La resistencia a cualquiera de estos antimicobacterianos complica el manejo de la enfermedad debido al alto costo y toxicidad de los medicamentos de segunda línea necesarios para el tratamiento, representando un pobre pronóstico de la TB (72). Por esta razón, la rápida detección de los aislados resistentes son críticos para un efectivo manejo de los pacientes.

Debido al aumento en la tasa de TB-MDR a nivel mundial, junto con la aparición de cepas TB-XDR, que son aquellas que además de ser resistentes a R e H, son resistentes a los principales medicamentos de segunda línea (uno de los tres inyectables amikacina, kanamicina o capreomicina y a una fluoroquinolona), el desarrollo de métodos rápidos y precisos para detectar resistencia a medicamentos

anti-TB, se convirtieron en una prioridad a nivel mundial. El método clásicamente utilizado por más de 50 años y recomendado por la OMS, es el de proporciones múltiples, realizado en el medio de cultivo Lowenstein Jensen (LJ). Sin embargo, es un método lento que retrasa la detección en la resistencia, poniendo en riesgo el apropiado tratamiento y aumentando la transmisión de las cepas drogo-resistentes. Este déficit, permitió el desarrollo de nuevas metodologías incluyendo el cultivo líquido automatizado y las pruebas moleculares y también han sido recomendadas por la OMS (73).

El estudio de farmacorresistencia en TB es de gran importancia en salud pública, principalmente en co-infección con el VIH, el uso de métodos moleculares acelera la caracterización y detección de TB-MDR, siendo una herramienta valiosa en el diagnóstico de la TB resistente, sin excluir el método fenotípico de susceptibilidad, que debe hacerse paralelamente. El método sistematizado BACTEC MGIT™ SIRE™ permite obtener resultados en menor tiempo y con una mayor efectividad en la recuperación de cultivos, comparado con el método de proporciones múltiples, por lo que se considera como una metodología de alta sensibilidad y especificidad (71). La metodología Genotype® MTBDRplus 2.0 puede ser utilizada a partir de medios líquidos y sólidos y de muestras directas. Se basa en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR para detectar CMT y las principales mutaciones en los genes *rpoB*, *katG* e *inhA*, que confieren resistencia a R e H respectivamente. Aunque ésta técnica permite obtener unos resultados en corto tiempo con una sensibilidad y especificidad por encima del 90%, no se puede utilizar para monitorear el tratamiento, debido a que detecta bacterias vivas o muertas pudiendo dar un resultado falso positivo (71).

4.6 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE LA TUBERCULOSIS

La Epidemiología Molecular es una nueva disciplina que combina las técnicas moleculares de genotipificación con las herramientas de la Epidemiología clásica. para determinar la dinámica de transmisión de las enfermedades infecciosas (74). La genotipificación de *Mycobacterium tuberculosis* es una poderosa herramienta para el control de la TB, como monitor de la transmisión de la enfermedad, detección y confirmación de brotes. Además permite determinar la presencia de pseudo-infecciones debidas a contaminaciones ocurridas en el laboratorio durante el procesamiento de muestras; diferencia si una recaída se debe a reactivación endógena o reinfección exógena con un nuevo genotipo de *M. tuberculosis*; permite reconocer si en una población los casos se deben a transmisión reciente o a

reactivaciones de TB latente (75). En el caso de la TB ha aportado información novedosa y muchas veces insospechada sobre la transmisión de la enfermedad (76).

Con la aparición de nuevas técnicas moleculares, ha quedado claro que los diferentes linajes de cepas de MTB son prevalentes en diferentes partes del mundo. El descubrimiento de secuencias de ADN repetitivas en el cromosoma de la bacteria, tales como la secuencia de inserción IS6110, ha permitido el desarrollo de técnicas moleculares confiables en la diferenciación de cepas de esta especie (77). El elemento IS6110 es uno de los elementos genéticos móviles presentes en los miembros del CMT (78) y mantiene la estabilidad necesaria para ser utilizado como herramienta diagnóstica en estos microorganismos (79, 80). Los elementos genéticos de inserción (IS) representan secuencias de ADN dispersas en los genomas bacterianos con actividad de transposición. Gracias a esta actividad, el número de copias de elementos IS y su localización en los genomas, varía entre distintos organismos de la misma especie. La movilidad junto a otros procesos como el de mutación genera mayor variación, diferencias que se traducen en la identificación de distintos linajes. Sin embargo, a pesar de su capacidad de movimiento, algunas IS son suficientemente estables, como para poder identificar organismos que provienen de un mismo ancestro, permitiendo, de esta manera, inferir la relación entre distintas cepas y descubrir sus relaciones evolutivas (81).

La composición genética de micobacterias no solo es importante para entender la epidemiología y distribución de *M. tuberculosis*, sino también la virulencia y susceptibilidad a medicamentos. El ejemplo más notable es la reciente aparición de la familia Beijing, que causa una enfermedad grave y representa una alta proporción de cepas TB-MDR (77). Este genotipo se ha diseminado por todo el mundo y su control plantea un gran desafío para la OMS y para los programas de control de TB (36).

Actualmente, se han desarrollado diversos métodos de tipificación que determinan y analizan la huella genética de cada microorganismo, estos se basan en el análisis del grado de similitud y distribución de estos elementos variables entre los aislados, en la presencia o ausencia de determinados fragmentos de ADN y en el estudio comparativo del genoma completo de los microorganismos (76). Estos métodos han brindado nuevos conocimientos sobre diversos aspectos de los fenómenos epidemiológicos de la TB que era poco posible identificar mediante los métodos de la microbiología convencional, como el diagnóstico sin sospecha clínica, el estudio de la TB latente, la determinación de factores de riesgo para TB en población

general y en grupos vulnerables (como los infectados con VIH/SIDA), la identificación de fuentes de contaminación en laboratorios u hospitales, y el estudio de la distribución geográfica de clones del CMT, así como el creciente problema de la TB-MDR y XDR (74).

La transmisión reciente se asume cuando se obtienen diversos aislados de *M. tuberculosis* que tienen huellas de ADN idénticas o muy similares, denominados “aislados agrupados” o en “cluster”. Por el contrario, cuando las cepas estudiadas exhiben patrones únicos de ADN, por lo general, se considera que se debe a la reactivación de una infección adquirida en el pasado. El ADN de *M. tuberculosis* se modifica progresivamente con el tiempo. En diversos estudios el tiempo necesario para que se modifique la huella de ADN (semivida) estudiada mediante RFLP de IS6110 fue calculado entre 2 y más de 30 años (76). Se asume que este tiempo debe variar en función de distintos factores, como la eficacia del tratamiento, el intervalo entre el inicio de la enfermedad y el del tratamiento y, probablemente, el predominio en cada zona de cepas más o menos estables del patógeno (82), así como la situación de latencia o de enfermedad activa (83).

4.7 CARACTERIZACIÓN Y EVOLUCIÓN DE *Mycobacterium tuberculosis*

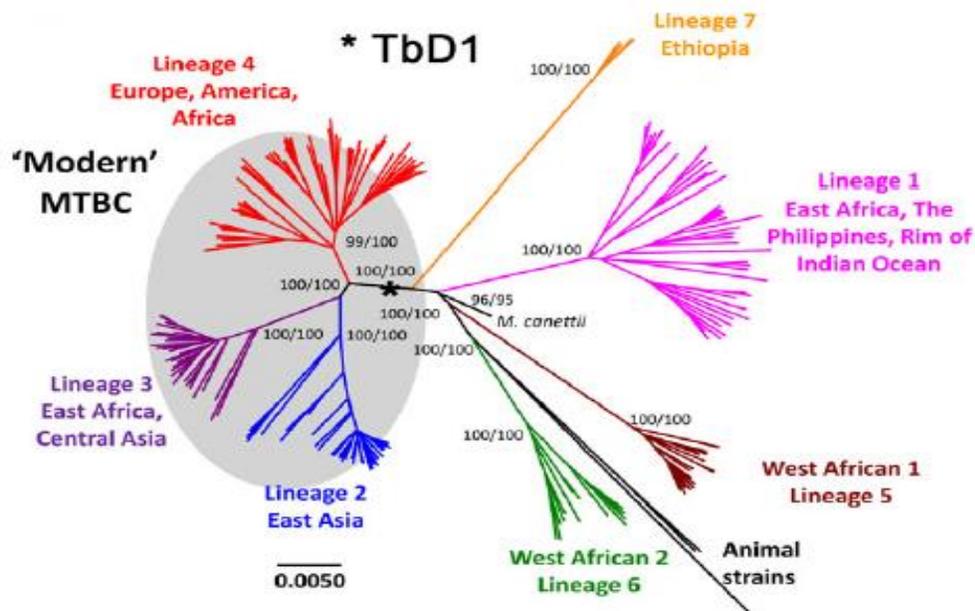
El grupo de micobacterias pertenecientes al CMT, se caracterizan por tener un 99.9% de similitud a nivel de núcleo y secuencias idénticas de rRNA 16S, pero difieren en cuanto a tropismo, fenotipo y patogenicidad. Debido a la gran conservación génica de los miembros del complejo, se ha sugerido que estos fueron sometidos a un cuello de botella evolutivo en el tiempo de especiación hace aproximadamente 15mil a 20mil años (84). En 1991 se alcanzaron los primeros éxitos en la obtención de secuencias repetitivas en el genoma de *M. tuberculosis*. Éste ha sido el punto de partida que ha permitido comparar las huellas genéticas de los distintos aislamientos y, por tanto, establecer diferencias entre diversas cepas. Al diferenciar las cepas aisladas, ha sido posible obtener nueva información sobre la epidemiología de la enfermedad, lo que ha permitido cambiar muchos conceptos sobre la transmisión de la TB, que habían sido aceptados durante décadas (76). Hace años, se pensaba que los humanos habían adquirido el bacilo de la TB durante el Neolítico a partir del ganado durante la domesticación de los animales, y que, por tanto, *M. tuberculosis* provenía de *M. bovis*. Sin embargo, los análisis genómicos demuestran que *M. bovis* ha perdido varios genes aún presentes en *M. tuberculosis*, y que por tanto las especies adaptadas al hombre son anteriores y más antiguas que *M. bovis* y otras micobacterias de animales, que surgieron posteriormente (34).

En ensayos de hibridación diferencial realizados a diferentes miembros del CMT, se identificaron 14 regiones de diferenciación (RD1-14), las cuales no estaban presentes en el genoma de la cepa vacunal bovina BCG (85, 86). Paralelamente, en 6 regiones de la cepa control de laboratorio H37Rv se encontraron las deleciones (RvD) 1-5 y la “deleción 1 específica de *M. tuberculosis*” (TbD1), la cual, estuvo ausente en el genoma de la cepa H37Rv. Las cepas con deleción de los genes *mmpS6* y *mmpL6*, y que presentaron TbD1 fueron denominadas “cepas modernas”, mientras que las que los tenían presentes se consideraron “Ancestrales” (16).

Las inferencias filogenéticas más recientes, revelan que los linajes de CMT adaptados a los humanos tienen una fuerte estructura filogeográfica, que comprende 7 linajes principales que divergen desde un ancestro común y se diversifican en diferentes regiones del mundo (15). Desde mediados del año 2000 a través de genómica comparativa y biología molecular, se identificaron polimorfismos de largas secuencias (LSPs) que permitieron diferenciar *M. tuberculosis* en 6 diferentes linajes definidos por su lugar de origen: Linaje 1 (Indo-Oceánico), Linaje 2 (Asia Oriental), Linaje 3 (Oriente de África y centro/sur de Asia), Linaje 4 (Euro-Americano), Linaje 5 (*M. africanum* África Occidental 1) y linaje 6 (*M. africanum* África Occidental 2) (87); recientemente se describió el Linaje 7 (Etiopia), y está restringido a Etiopia, el cual representa una rama filogenética intermedia entre los linajes ancestrales y modernos (88). Los Linajes 2 y 4 son geográficamente más expandidos que los demás y dentro de los Linajes, los sublinajes también difieren en su distribución geográfica (15) (Figura 1). Métodos de genotipificación tales como spoligotyping, MIRU-VNTR o polimorfismos de nucleótido único (SNP), han proporcionado alta resolución a nivel de sublinajes y han corroborado la división de *M. tuberculosis* en los principales linajes (89).

La expansión humana y la alta densidad de la población en las ciudades sobrepobladas en los siglos XVIII y XIX en Europa, pudieron haber tenido una selección “menos cautelosa” de las bacterias, ya que el acceso a los huéspedes susceptibles no era un factor limitante. Esto podría explicar por qué los linajes modernos son más virulentos y tienen mayor éxito evolutivo, lo que permite inferir una eficiente propagación geográfica comparados con los linajes ancestrales (34)

Figura 1. Filogenia del genoma completo de 220 cepas de CMT



* Los círculos grises indican las cepas “modernas”. la aparición de la delección TbD1 está indicada con un asterisco. Tomado de Comas I. y col. (90). Y adaptada por Brites D. y Gagneux S. (15)

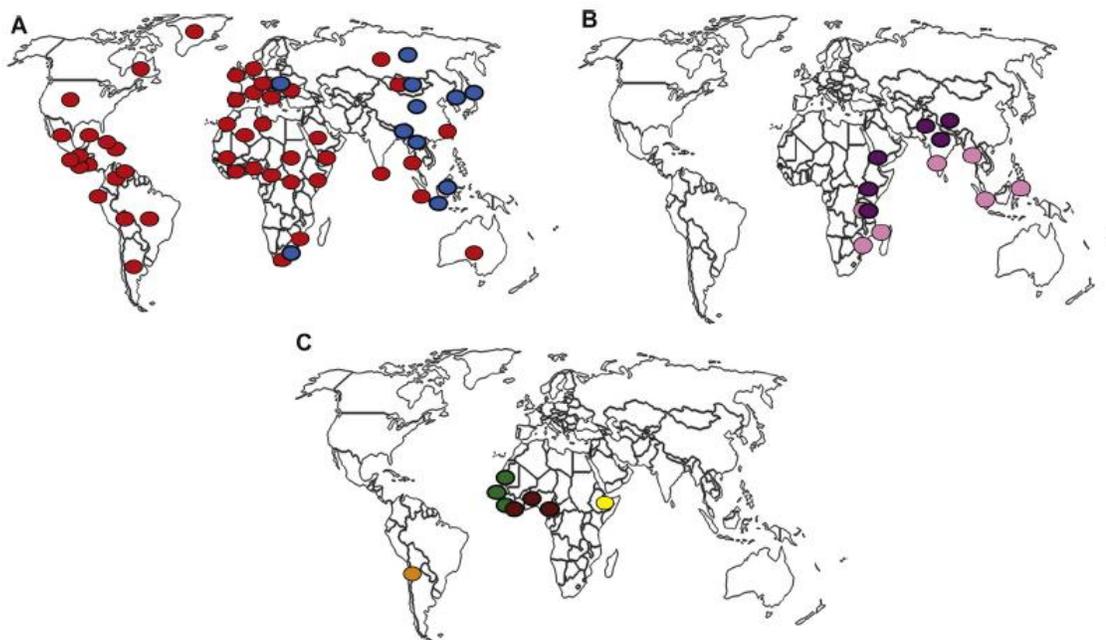
Todos los linajes del CMT son divididos en sublinajes, basados en la metodología de spoligotyping. Las bases de datos creadas alrededor del mundo, incluyen 7.104 spoligotipos correspondientes a 58.187 aislados clínicos obtenidos en 102 países (91). De los 7.104 spoligotipos, 24 representan la mayoría de los aislados clínicos caracterizados. Esto podría indicar que algunas familias se transmiten más eficientemente que otras (92). Los sublinajes más grandes representados son:

- Beijing: se describió en 1995, se caracteriza por la pérdida de un gran número de secuencias (93). Representan alrededor del 50% de las cepas en el Lejano Oriente de Asia y el 13% de los aislados globales (92).
- CAS (Central Asian): Descrito por Bhanu NV., y col. en el 2002; se caracteriza por la ausencia de los espaciadores 23 a 34 (94). Esencialmente localizado en el sur de Asia e India; sin embargo, también se encontró en África, América Central, Europa, lejano oriente de Asia, Norte América y Oceanía (92).
- East African Indian (EAI): Descrito en 1999 por Källenius G. y col., no posee los espaciadores 29 a 32 ni el 34 (95). Es más prevalente en el sur este de Asia (92).

- Haarlem (H): descrito por Kremer K. y col en 1999 en Holanda, este se caracteriza por la ausencia del espaciador 31 (96). Representa el 25% de las cepas de Europa y América (92).
- LAM (Latin American Mediterranean): se caracteriza por la ausencia de los espaciadores 21 a 24 (97). Su mayor presencia se encuentra en Venezuela, el Mediterraneo y la región del Caribe (92).
- MANU: nueva familia de la India, no posee el espaciador 34. Se encuentra principalmente en el lejano Oriente de Asia, Oriente Medio - Asia Central y Oceanía (92).
- T: conocido como cepas modernas de TB. No posee los espaciadores 33 a 36. Fue encontrado en todos los continentes y corresponde al 30% a nivel mundial (92).
- X: se caracteriza por la ausencia del espaciador 18 (98). Es prevalente en UK, Estados Unidos y colonias británicas. Está relacionada con ancestros británicos (92).
- S: es altamente prevalente en Sicilia y Sardinia (92).

Estos sublinajes han sido asociados a transmisión de TB y epidemias. Especialmente el genotipo Beijing, que es ubicuo y se ha dispersado en muchos países, igual que la familia LAM que también está extendida en África (34). Un reciente análisis de los genomas de *M. tuberculosis* tomados de esqueletos peruanos de la época precolombina, sugiere que los mamíferos marinos pudieron desempeñar un papel en la transmisión de TB. Estos datos, apoyan la hipótesis de la introducción del CMT en el continente americano a través de pinnípedos, seguido de la adaptación humana y su posterior propagación en el territorio (99). Los fenotipos Haarlem y LAM tienen una amplia distribución mundial representando el 25% de los aislamientos en Europa, América central y el Caribe (15, 100). En América Latina, LAM es el que tiene la mayor frecuencia (13, 26). (Figura 2).

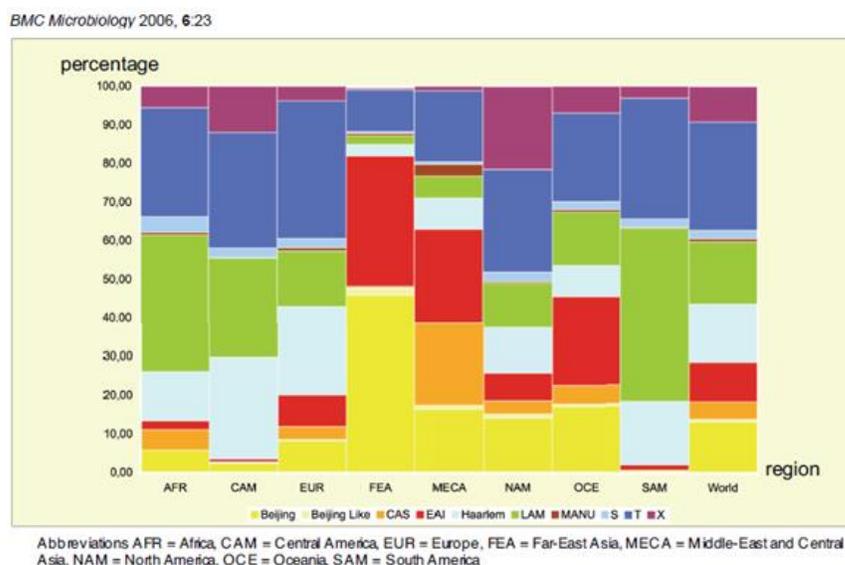
Figura 2. Distribución Geográfica de los Linajes del CMT



A. Muestra los linajes mayormente dispersos alrededor del mundo. **B.** los linajes medianamente dispersos y **C.** los linajes más restringidos geográficamente. Tomado de Coscolla M. y Gagneux S., 2014 (22). El círculo lila, representa el Linaje 1; el azul, representa el Linaje 2; el morado, representa el linaje 3; el rojo, representa el linaje 4, el café, representa el linaje 5; el verde, representa el linaje 6 y el círculo amarillo representa el linaje 7.

La actualización de la base de datos internacional “SpolDB4” se realizó teniendo en cuenta cepas obtenidas de diferentes países, considerando la diversidad del origen de los pacientes. La frecuencia de cada familia se calculó evaluando las 8 regiones del continente determinadas por la OMS. Los principales linajes representados se encuentran presentes en todas las regiones, y su proporción varía de acuerdo a cada región. El sublinaje T se encuentra distribuido en todas las regiones; la cepa Beijing representa el 13% de los aislados globales y su mayor proporción se encuentra en el lejano Oriente de Asia. Los espoligotipos huérfanos representaron el 35,7% y 16,9% de los aislamientos de Europa y Norte América respectivamente, mientras que en otras regiones se encuentran en proporción entre 1,2% a 11,5% (Figura 3).

Figura 3 Filogeografía de los principales sublinajes de *Mycobacterium tuberculosis*.



Porcentaje de las principales familias de CMT definidos por spoligotyping dentro de SpolDB4. (Beijing, Beijing-like, CAS, EAI, Haarlem, LAM, Manu, X, T), por continentes estudiados y en todo el mundo. Abreviaciones: AFR=África, CAM=América Central, EUR=Europa, FEA=lejano oriente de Asia, MECA=medio oriente y centro de Asia, NAM=Norte América, OCE=Oceania, SAM=Sur América. Tomado de Brudey K.y co.I, 2006 (92).

4.8 MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE *Mycobacterium tuberculosis*

La identificación rápida y precisa de las micobacterias a nivel de especie a partir de muestras clínicas o de cultivos positivos, tiene gran importancia clínica y epidemiológica. Esta identificación permite la diferenciación entre patógenos habituales y oportunistas, definiendo, de esta manera, la conducta a seguir con respecto al tratamiento (101).

Los métodos alternativos de identificación más comunes provienen del desarrollo de técnicas moleculares aplicadas a la identificación genotípica. Estas técnicas están basadas en la amplificación de ADN bacteriano por PCR acompañadas por el estudio de polimorfismos generados por la digestión con enzimas de restricción, la hibridación con sondas específicas, o la secuenciación de cadenas nucleotídicas (101).

En estudios realizados por Kremer K. y col. en 1999 (96) y Supply P. y col. en el 2001 (102), se compararon cinco métodos de RFLP y ocho metodologías basadas en PCR. Se observó que, a pesar del potencial de las técnicas rápidas de amplificación para la caracterización de cepas de *M. tuberculosis*, más de la mitad de los métodos utilizados tenían como limitación fundamental su reproducibilidad y/o poder de discriminación. De estos, los que mejores resultados aportaron fueron RFLP-IS6110, este último se basa en la amplificación del locus DR compuesto por repeticiones directas de 36 pb y la determinación de la presencia o ausencia de las secuencias espaciadoras que las separan (96).

Actualmente, la secuenciación del genoma completo de los microorganismos está siendo ampliamente utilizada para caracterizar genomas individuales, transcripción y variación genética de las poblaciones y las enfermedades (103). Esta técnica, constituye una herramienta importante para el estudio de la TB, proporcionando un alto poder de comprensión y discriminación para medir la diversidad genética y puede ser utilizada para análisis filogenéticos y clasificación de *M. tuberculosis*. Adicionalmente, con la continua reducción de sus costos puede ser considerada próximamente como la “prueba de oro” para la genotipificación epidemiológica de *M. tuberculosis* (14).

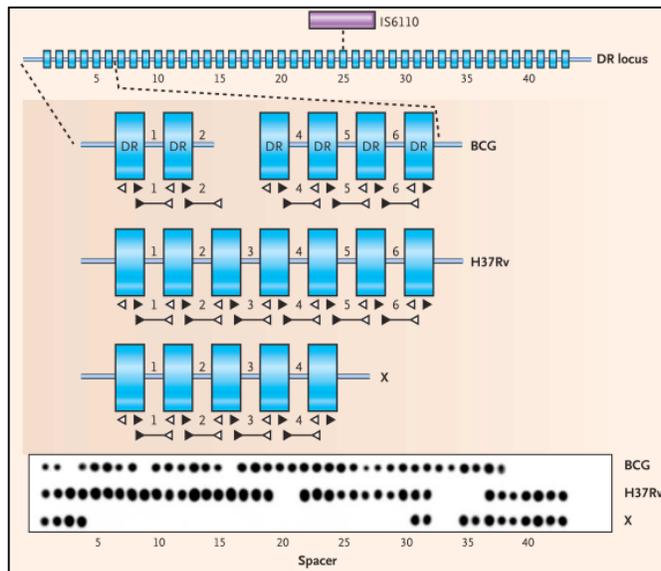
4.8.1 RFLP-IS6110. Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos Largos de Restricción (restriction fragment length polymorphism)

RFLP-IS6110 fue considerada la prueba de oro para genotipificar y caracterizar cepas de *M. tuberculosis* debido a la variabilidad existente entre cepas, en el número de copias de la IS6110 y de su localización en el genoma de la micobacteria. Ésta metodología se basa en el polimorfismo de los fragmentos largos de restricción que se obtienen después de cortar el ADN genómico con la enzima de restricción Pvu II. Se fundamenta en estudiar el número de veces que la secuencia de inserción IS6110 se repite en el genoma de la micobacteria (generalmente entre 1 y 25 veces) y aunque es una técnica muy reproducible, su mayor limitación es que no puede ser utilizada si la micobacteria tiene menos de 6 copias de esta secuencia en su cromosoma, en tal caso, se deben realizar otros métodos genotípicos. Adicionalmente, la genotipificación basada en IS6110 requiere de subcultivos de los aislados por algunas semanas para obtener suficiente ADN. Los aislados de pacientes infectados con cepas no relacionadas epidemiológicamente tienen patrones RFLP diferentes, mientras que los pacientes con cepas relacionadas epidemiológicamente por lo general tienen patrones RFLP idénticos (104).

4.8.2 Spoligotyping (Spacer Oligotyping) “Espoligotipado”

Las cepas del CMT contienen una única región en el cromosoma que consta de múltiples repeticiones directas (DRs) de 36 pb, éstas se encuentran intercaladas por espaciadores únicos que varían en tamaño de 35 a 41 pb (105) y es altamente polimórfico (106) (Figura 4). El número de DRs y la presencia o ausencia de espaciadores es variable entre las cepas. Su polimorfismo probablemente se debe a recombinaciones homólogas entre DRs cercanos o distantes y rearrreglos producidos por el elemento de inserción IS6110, el cual está presente en la mayoría de cepas de MTB (105). Esto puede llevar a la pérdida de sus espaciadores, las cuales son irreversibles (107).

Figura 4. DRs y espaciadores utilizados en Spoligotyping.



*En la parte superior se muestran los 43 DR (rectángulos) y espaciadores (líneas horizontales) usados en spoligotyping. En la mitad de la sección se muestran los productos amplificados por PCR de espaciadores 1 a 6 de *M. bovis* bacille Calmette–Guérin (BCG), *M. tuberculosis* cepa H37Rv y *M. tuberculosis* cepa hipotética X con el uso de primers (flechas blancas y negras) en cada extremo del locus DR. La sección inferior muestra los spoligotipos de las tres cepas. Tomado de Barnes PF. y col., 2003 (104).

El spoligotyping, es una metodología basada en la amplificación de ADN de DRs y la presencia/ausencia de los espaciadores indican los diferentes patrones de hibridación del ADN amplificado. La hibridación es realizada con múltiples oligonucleótidos sintéticos de los espaciadores y son unidos covalentemente a una membrana de nylon (108) (Tabla 1). Para la genotipificación se utilizan sólo 43 secuencias espaciadoras de las 94 que se han encontrado. Para visualizar los 43 espaciadores amplificados, uno de los dos primers está marcado con biotina.

Posteriormente, los puntos de hibridación se revelan con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa, éste se une a la biotina, que al agregar el sustrato luminol forman un complejo luminoso. La reacción enzimática que se produce quema una placa radiográfica. El punto observado corresponde a cada espaciador hibridado, de esta forma se determinan los espaciadores presentes o ausentes en cada aislado evaluado (109).

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos unidos a la membrana de nylon.

N° de Espaciador	Secuencia de los Oligonucleótidos	N° de Espaciador	Secuencia de los Oligonucleótidos
1	ATAGAGGGTCGCCGGTTCTGGATCA	23	AGCATCGCTGATGCGGTCCAGCTCG
2	CCTCATAATTGGGCGACAGCTTTTG	24	CCGCCTGCTGGGTGAGACGTGCTCG
3	CCGTGCTTCCAGTGATCGCCTTCTA	25	GATCAGCGACCACCGCACCTGTCA
4	ACGTCATACGCCGACCAATCATCAG	26	CTTCAGCACCACCATCATCCGGCGC
5	TTTTCTGACCACTTGTGCGGGATTA	27	GGATTCTGATCTCTTCCCGCGGAT
6	CGTCGTCATTTCCGGCTTCAATTC	28	TGCCCCGGCGTTTAGCGATCACAAC
7	GAGGAGAGCGAGTACTCGGGGCTGC	29	AAATACAGGCTCCACGACACGACCA
8	CGTAAAACGCCCGCCAGCCTCGCCG	30	GGTTGCCCGCGCCCTTTTCCAGCC
9	ACTCGGAATCCCATGTGCTGACAGC	31	TCAGACAGGTTGCGTGCATCAAGT
10	TCGACACCCGCTCTAGTTGACTTCC	32	GACCAAATAGGTATCGGCGTGTTC
11	GTGAGCAACGGCGGGCAACCTGG	33	GACATGACGGCGGTGCCGCACTTGA
12	ATATCTGCTGCCCGCCGGGAGAT	34	AAGTCACCTCGCCACACCGTCGAA
13	GACCATCATTGCCATTCCCTCTCCC	35	TCCGTACGCTCGAAACGCTTCCAAC
14	GGTGTGATGCGGATGGTCCGGCTCGG	36	CGAAATCCAGCACCACATCCGCAGC
15	CTTGAATAACGCGCAGTGAATTCG	37	CGCGAACTCGTCCACAGTCCCCCTT
16	CGAGTTCCCGTCAGCGTCGTAATC	38	CGTGGATGGCGGATGCGTTGTGCGC
17	GCGCCGGCCCGCGCGGATGACTCCG	39	GACGATGGCCAGTAAATCGGCGTGG
18	CATGGACCCGGGCGAGCTGCAGATG	40	CGCCATCTGTGCCTCATAAGGTCC
19	TAAGTGGCTTGGCGCTGATCCTGGT	41	GGAGCTTTCGGCTTCTATCAGGTA
20	TTGACCTCGCCAGGAGAGAAGATCA	42	ATGGTGGGACATGGACGAGCGCGAC
21	TCGATGTCGATGTCCCAATCGTCGA	43	CGCAGAATCGCACCGGGTGCGGGAG
22	ACCGCAGACGGCAGATTGAGACAA		

* Tomado de Kamerbeek y col., 1997 (108)

El spoligotyping es un método muy utilizado por su relativa simplicidad, rapidez y bajo costo. Los resultados se expresan en códigos binarios de 43 dígitos construidos por la presencia (1) o ausencia (0) de los espaciadores, que permiten crear bases de datos simples, con código binarios u octales (Figura 4). Estos resultados posteriormente son analizados filogenéticamente para determinar los clusters según su similitud genética. La codificación permite comparar fácilmente el genotipo de cepas aisladas en diferentes laboratorios en todo el mundo (107). Los datos obtenidos se comparan con una base de datos internacional que tiene más de

11.000 SITs (Spoligotype International Type) de aislados obtenidos en más de 90 países, de esta manera se obtiene la identificación de los diferentes linajes y sublinajes de cada aislado del CMT.(97).

A pesar de las ventajas que tiene esta técnica, mencionadas previamente, su poder de discriminación es bajo, por lo tanto, necesita de otra técnica que permita una mayor diferenciación entre cepas (104).

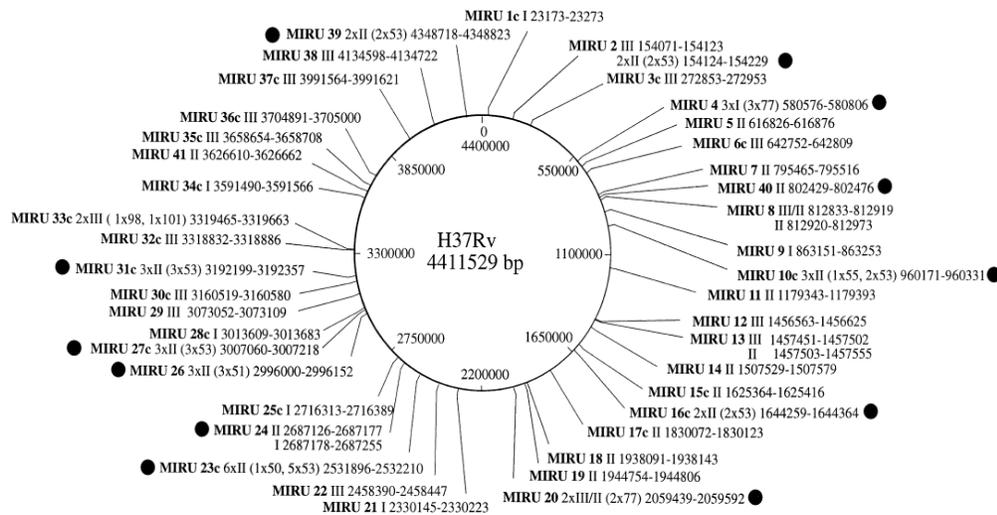
4.8.3 MIRU-VNTR. Unidades Repetitivas Micobacterianas Interespaciadas - Número Variable de Repeticiones en Tándem (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units -Variable Number of Tandem DNA Repeats)

Las secuencias repetidas en tándem están dispersas en miles de copias en los genomas eucariotas superiores. Los loci con repeticiones de secuencias cortas (SSRs) de 1-13 pb son llamados generalmente microsatélites, y los que tienen de 10-100 pb secuencias repetidas son llamados minisatélites. Muchos de estos loci, muestran hipervariabilidad en su número de repeticiones tanto en humanos, como en animales. Estos también son llamados loci de repeticiones en tándem de número variable (VNTR) y son una gran herramienta para el estudio de evolución y estudios de pedigree (110-112). El tamaño de cada amplicón indica el polimorfismo del VNTR y se expresa como el número de copias que contiene. Las secuencias VNTR han emergido como marcadores para genotipificación de algunas especies bacterianas, especialmente para patógenos genéticamente homogéneos tales como *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* y los miembros del CMT (113-115).

Teniendo en cuenta la estructura genética dentro del genoma de *M. tuberculosis*, 11 loci VNTR fueron divididos en MPTRs (secuencias repetidas polimórficas principales en serie) y ETRs (secuencias repetidas en serie exactos). Los MPTRs presentan secuencias repetidas homogéneas de 10 pb, más un espaciador adyacente variable de 5 pb. De los 5 MPTRs analizados (A-E) solo se observa un ligero polimorfismo en MPTR A. Los ETR 6-VNTR son secuencias polimórficas repetidas de 53 a 79 pb (ETR A –ETR F). Estos últimos tienen gran reproducibilidad, pero su poder discriminatorio es muy bajo comparado con RFLP-IS6110 (116). Otros VNTRs fueron descritos en la Universidad de Queen de Belfast, con secuencias repetidas de 56 a 60 pb y fueron denominados como QUB, son similares a ETR en cuanto a reproducibilidad y poder discriminatorio (109).

Supply P. y col. en el año 2000, reportaron la identificación de minisatelites en el genoma de *M. tuberculosis*. Estas estructuras están compuestas de secuencias repetidas llamadas MIRU de 40 a 100 pb y se encontraron dispersas en 41 sitios del cromosoma de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* (Figura 5). Los MIRU han sido clasificados en tres grupos principales. Tipo I: secuencias que contienen alrededor de 77 a 101pb. Tipo II de 46 a 53 pb y Tipo III de 58 a 101pb. Se estiman alrededor de 40 a 50 MIRU en el genoma de *M. tuberculosis*; algunas contienen unidades repetidas idénticas y otras contienen repeticiones que varían ligeramente en secuencia y longitud (111).

Figura 5. Posición de 41 loci MIRU en el cromosoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.



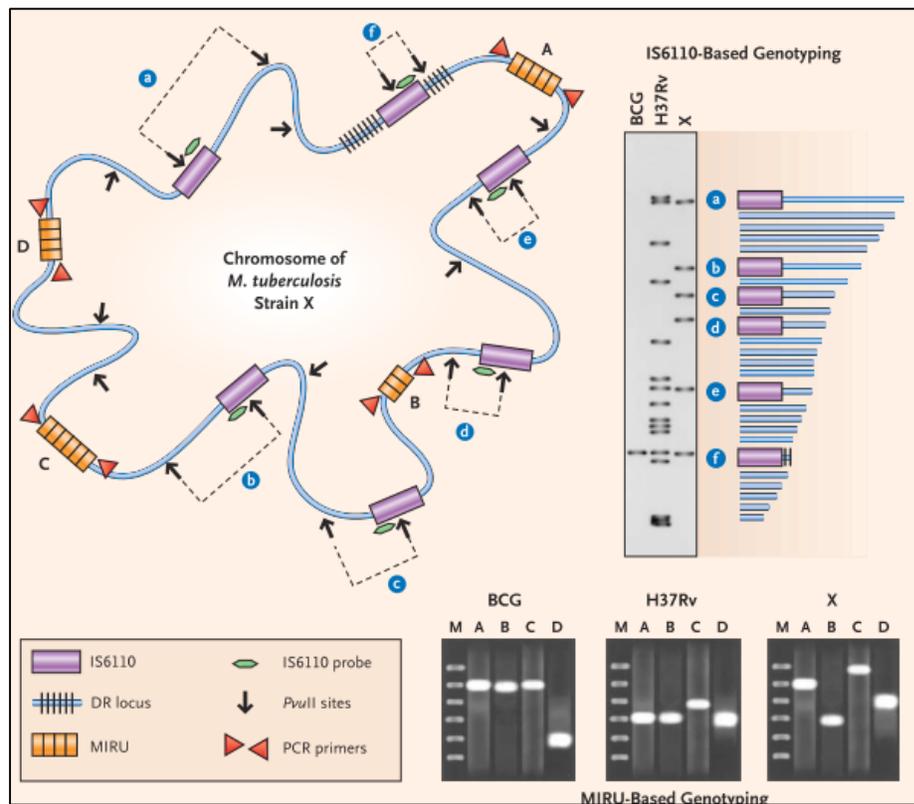
* Los números arábigos en negrilla indican el número de locus MIRU, los números romanos indican el tipo de MIRU (I, II, III). Tomado de Supply y col, 2000 (110).

Inicialmente, se observó que 12 de estos loci presentaban polimorfismos en el número de copias MIRU entre aislados de *M. tuberculosis* no relacionados. Por lo tanto, los sistemas iniciales de tipificación VNTR para las cepas del CMT hacían uso de dichos loci (12 loci) (110). Sin embargo, no resultó ser suficientemente discriminatorio (96). Posteriormente se utilizaron 15 loci y en la actualidad se están utilizando 24 loci altamente polimórficos y con un mayor poder discriminatorio (11).

La genotipificación basada en VNTR de diferentes clases de MIRU categoriza el número y tamaño de las copias de cada MIRU independiente, mediante la amplificación de múltiples loci usando primers específicos para las regiones que flanquean cada locus mediante PCR, y visualizando por electroforesis (Figura 6). En cada uno de los loci hay de 2 a 8 alelos, lo que da lugar a más de 20 millones de

posibles combinaciones de ellos. El poder discriminatorio de la genotipificación por MIRU-VNTR es generalmente similar al RFLP IS6110, con la diferencia que su análisis puede ser automatizado y de esta manera ser utilizado para la evaluación de un gran número de cepas, produciendo resultados digitales intrínsecos que pueden ser organizados en una base de datos. Un sitio Web ha sido configurado para que una base de datos mundial de patrones MIRU pueda ser creada (11, 104). La tipificación por MIRU-VNTR ha mostrado una buena reproducibilidad y un aceptable poder de discriminación (96); es una técnica menos compleja que la genotipificación basada en RFLP-IS6110 y puede ser aplicada directamente a cultivos de *M. tuberculosis* sin necesidad de purificar el ADN (104)

Figura 6. Cromosoma de *Mycobacterium tuberculosis* de la cepa hipotética X.



* Genotipificación de *M. bovis* Bacille Calmette–Guérin (BCG), la cepa del Laboratorio de *M. tuberculosis* H37Rv y la cepa X sobre la base de secuencias de inserción IS6110 y MIRU. Tomado de Barnes y col., 2003 (104)

5. METODOLOGÍA

5.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio descriptivo de corte transversal, que analizó los genotipos circulantes de *Mycobacterium tuberculosis* aislados de pacientes VIH positivos.

5.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Pacientes VIH positivos mayores de 18 años que asistieron a los Hospitales Simón Bolívar y Santa Clara de Bogotá, durante el periodo comprendido entre octubre de 2014 y noviembre de 2015, a los cuales se les diagnóstico TB mediante cultivo líquido sistematizado (MGIT™) y/o sólido (LJ, STG) dentro del proyecto de investigación titulado “DETECCIÓN DE TUBERCULOSIS Y MICOBACTERIOSIS EN INDIVIDUOS VIH POSITIVOS DE LOS HOSPITALES SIMÓN BOLÍVAR Y SANTA CLARA DE BOGOTÁ, EN LA ERA DEL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL DE GRAN ACTIVIDAD (TARGA)”, cuyo objetivo general es “Establecer una búsqueda intensiva de casos de tuberculosis entre personas que conviven con el VIH/SIDA (PVVS), en la era de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) en los Hospitales Simón Bolívar y Santa Clara de Bogotá”. El estudio fue aprobado por el comité de Ética y el Comité de Investigación y Docencia de la Universidad Nacional de Colombia, el Hospital Simón Bolívar y el Hospital Santa Clara de la ciudad de Bogotá.

5.3 MUESTRA

La muestra estuvo conformada por 49 aislados de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidos de 36 pacientes VIH positivos mayores de 18 que asistieron a los hospitales Simón Bolívar y Santa Clara de Bogotá que aceptaron participar voluntariamente.

5.4 VARIABLES DEL ESTUDIO

Las variables epidemiológicas se obtuvieron de la encuesta general utilizada en el proyecto general previamente mencionado. Para el presente estudio se tuvieron en cuenta las siguientes variables: edad, género, raza, lugar de nacimiento, tipo de

vinculación a seguridad social, tipo de servicio asistencial, lugar de residencia (privado de la libertad, habitante en situación de calle, hogar geriátrico), tiempo de adquisición de la infección por VIH, recuento reciente de linfocitos CD4+, resultado de carga viral, tratamiento antirretroviral, tos, expectoración, radiografía de tórax, cicatriz BCG, tuberculosis previa, tratamiento antituberculoso previo, interrupción de tratamiento antituberculoso previo, reinicio de tratamiento antituberculoso, terminación del tratamiento antituberculoso, enfermedades autoinmunes, enfermedades oportunistas, ETS, hepatitis, diabetes mellitus, trasplantes, tratamiento con corticoides, consumo de sustancias psicoactivas, consumo de alcohol, consumo de cigarrillo, síntomas que presentaron en el momento de la consulta u hospitalización, peso, talla, temperatura corporal y tensión arterial. En el Anexo 1 se muestra la encuesta aplicada a los pacientes para obtener la información de las variables epidemiológicas.

5.5 RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

Los datos de los pacientes fueron obtenidos de acuerdo a la encuesta realizada para tal fin, de la que se obtuvo información clínica y epidemiológica de cada uno de ellos. Esta información junto con los resultados fue almacenada en una base de datos de Microsoft Access2007®, en el laboratorio de Micobacterias de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y exportada a Microsoft Excel® para su análisis.

5.6 DISPOSICIONES ÉTICAS

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Nacional de Colombia y de los Hospitales participantes. Cada paciente que decidió participar voluntariamente en el estudio firmó un consentimiento informado (Anexo 2); el profesional que tomó los datos explicó en qué consistía el proyecto y aclaró las dudas que se presentaron, se protegió la privacidad del individuo y se cumplió con los principios éticos conforme a la resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, teniendo en cuenta las buenas prácticas clínicas del Tratado de Helsinki.

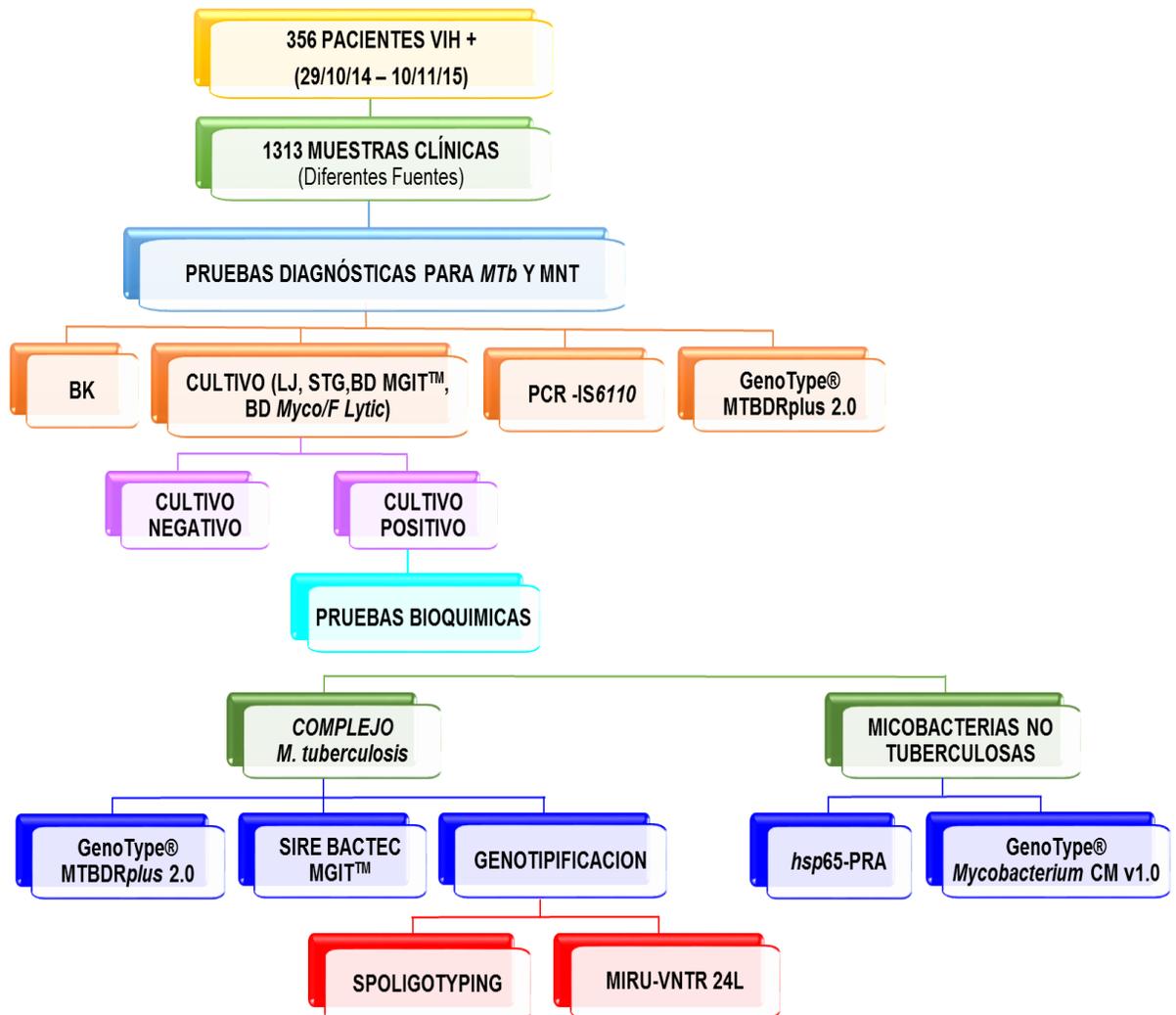
5.7 RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

La captación de pacientes se llevó a cabo en los servicios de consulta externa y hospitalización, en coordinación con los programas de VIH y TB de los Hospitales

participantes en el estudio. Las muestras recolectadas de cada paciente fueron: sangre, esputo espontáneo o inducido, líquidos corporales (pleural, cefalorraquídeo y peritoneal), lavados broncoalveolares (LBA), lavados bronquiales, materia fecal, secreciones (cervicales, absceso de psoas, de glande y osteoarticular) y biopsias (de piel, pulmón, pleura, glande e intestino). Cada una de ellas fue rotulada y transportada al Laboratorio de Micobacterias de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia según los criterios establecidos.

En la Figura 7 se muestra el esquema de trabajo a partir de la captación del paciente para obtener los aislados clínicos y su respectiva genotipificación.

Figura 7. Flujograma para la obtención de aislados de *M. tuberculosis*



5.7.1. Baciloscopia

Se realizó la baciloscopia a cada muestra excepto a las biopsias parafinadas de acuerdo al protocolo estandarizado (117).

5.7.2. Cultivo

Las muestras que provenían de sitios contaminados con flora comensal se descontaminaron por el método de NaOH/N-acetil-cisteína de acuerdo al protocolo de la OPS (117), mientras que las que provenían de sitios estériles se procesaron sin descontaminar. Posteriormente se cultivaron en medio líquido MGIT™ (BACTEC™ System, Becton Dickinson) y medios sólidos Löwenstein-Jensen (LJ) y Stonebrink modificado por Giraldo (STG). Los cultivos en medio líquido se incubaron a 37°C en el equipo BACTEC™ MGIT™ 320 durante 42 días, los medios sólidos fueron incubados a la misma temperatura que los líquidos durante 12 semanas, y se observaron semanalmente.

En el momento previo al cultivo, se tomó una alícuota de 200 µl de cada muestra para la realización de pruebas moleculares basadas en amplificación de ADN, tales como PCR-IS6110 y GenoType® MTBDRplus 2.0, esta última para detección de susceptibilidad a Rifampicina e Isoniazida. Las biopsias parafinadas fueron sometidas a proceso de maceración, posteriormente extracción de ADN y pruebas moleculares mencionadas anteriormente.

A los medios de cultivo en los cuales se evidenció crecimiento bacteriano se les realizó coloración de Ziehl Neelsen, para confirmar la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), seguida por un proceso de identificación por medio de pruebas fenotípicas que incluyeron: detección de niacina, detección de actividad de catalasa a temperatura ambiente y a 68°C y reducción de nitratos; también se empleó el ensayo inmunocromatográfico que detecta la presencia de la proteína secretora MPT64. (BD MGIT™ TBc Identification Test (TBc ID)).

Posteriormente a los aislados bacterianos se les realizó extracción de ADN con el método comercial GenoLyse®. Esta metodología se realizó de acuerdo a los protocolos de manufactura, con algunas modificaciones:

1. Se adicionaron 100 µl de buffer de lisis A-LYS a un vial de 1.5ml previamente identificado con el número de muestra de interés.

2. Mediante raspado con una espátula de madera, se adicionaron en el buffer aproximadamente 3mm de masa bacilar a partir del medio LJ. Inmediatamente se homogenizaron en agitador vórtex por 1 minuto.
3. Se incubó a 95°C durante 5 minutos o hasta que el líquido estuviera turbio.
4. Se adicionaron 100 µl del buffer A-NB para neutralizar la reacción.
5. Se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se coleccionó en otro vial de 1.5ml identificado con el mismo número de la cepa y se descartó el pellet.
6. El ADN obtenido se almacenó a -70°C para su proceso de amplificación. La presencia de ADN se confirmó en un gel de agarosa al 1%.
7. Cada cepa a la cual se le realizó la extracción de ADN fue subcultivada por duplicado en medio LJ para su preservación.

Los aislados identificados como micobacterias no tuberculosas fueron caracterizados mediante la prueba molecular PRA-*hsp65* (Análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción del gen *hsp65*).

Los aislados identificados como *M. tuberculosis* obtenidos fueron utilizados para cumplir con los objetivos de la presente tesis.

METODOS PARA CUMPLIR EL OBJETIVO GENERAL Y EL OBJETIVO ESPECIFICO 1. “Caracterizar clínica y epidemiológicamente los pacientes coinfectados VIH-TB”

5.8 CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y EPIDEMIOLÓGICA DE LOS PACIENTES COINFECTADOS VIH-TB.

Se exportó la base de datos creada previamente en Microsoft Access 2007® a Microsoft Excel 2007®, donde se incluían las variables clínicas y epidemiológicas de los pacientes, adicionalmente se registró el resultado de la baciloscopia, prueba de susceptibilidad por BACTEC™ MGIT™ SIRE y GenoType® MTBDR*plus* 2.0, el resultado del patrón de Spoligotyping y de MIRU-VNTR.

5.9 ANÁLISIS DE DATOS

Se utilizaron herramientas estadísticas descriptivas, variables continuas como medias, medianas y variables categóricas como porcentajes y proporciones. Para efectuar la comparación de variables entre grupos (cepas agrupadas vs variables

demográficas y clínicas) se utilizaron pruebas exactas de Fisher. Las pruebas de hipótesis se evaluaron tomando un nivel de significación de 0,05.

La mortalidad se estimó como tasa de densidad de incidencia en la cual el denominador fue el total de seguimiento aportado por todos los pacientes y el nominador el número total de eventos durante el tiempo de seguimiento. Estas tasas fueron expresadas en términos de 100 pacientes x mes. Los resultados se analizaron con el programa STATA 12®.

METODOS PARA CUMPLIR EL OBJETIVO GENERAL Y EL OBJETIVO ESPECIFICO 2. “Identificar patrones de susceptibilidad a medicamentos antituberculosos de primera línea en los aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidos”.

La susceptibilidad de los aislados clínicos de *M. tuberculosis* se realizó mediante metodología convencional microbiológica BACTEC MGIT™ SIRE y la técnica molecular GenoType® MTBDR*plus* 2.0.

5.10 MÉTODO BACTEC™ MGIT™ SIRE

El método MGIT™ (tubo indicador de crecimiento micobacteriano de Becton Dickinson, Maryland, USA) se introdujo en 1995 y se emplea como método alternativo para susceptibilidad antimicobacteriana. El medio MGIT contiene caldo Middlebrook 7H9 modificado con un compuesto fluorescente embebido en silicona en la parte inferior del tubo, este compuesto es sensible a la presencia de oxígeno disuelto en el caldo. Cuando hay crecimiento bacteriano, los microorganismos al respirar consumen el oxígeno disuelto en el medio haciendo que el sistema automatizado detecte la fluorescencia.

BACTEC™ MGIT™SIRE es una prueba cualitativa que puede durar de 4 a 13 días. Esta prueba se basa en el crecimiento de aislados del CMT en un tubo que contiene medicamento anti-TB comparado con un tubo sin medicamento (control de crecimiento) (70).

Una vez identificados como CMT, los cultivos líquidos con un crecimiento menor a 5 días de incubación se utilizaron para la realización de pruebas de susceptibilidad por MGIT™SIRE, siguiendo las instrucciones de manufactura (70). Para la preparación del inóculo la suspensión bacteriana se ajustó a una concentración final

de 1 en la escala de McFarland—utilizando el nefelómetro BD PhoenixSpec y posteriormente se realizó una dilución 1:5 en agua destilada estéril.

La preparación de los antibióticos se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante como se muestra en la Tabla 2. Para la realización de la prueba, se utilizaron 5 tubos de medio líquido MGIT™; uno correspondiente al control de crecimiento, y los otros cuatro correspondientes al antibiótico a evaluar.

Tabla 2. Concentraciones de los antibióticos para BACTEC™ MGIT™ SIRE

Medicamento	Concentración del medicamento post-reconstitución*	Volumen adicionado a los tubos MGIT	Concentración final en los tubos MGIT™
MGIT S	83 µg/mL	100 µL	1.0 µg/mL
MGIT H	8.3 µg/mL	100 µL	0.1 µg/mL
MGIT R	83 µg/mL	100 µL	1.0 µg/mL
MGIT E	415 µg/mL	100 µL	5.0 µg/mL

* Los antibióticos se reconstituyeron en 4ml de agua estéril desionizada para mantener la concentración requerida. *Tomado de: BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE Kit for the Antimycobacterial Susceptibility Testing of M. tuberculosis Manual (70)*

A cada tubo MGIT™ se le agregaron 800 µl del suplemento para SIRE provisto en el kit, se agregaron 100 µl del antibiótico correspondiente en cada tubo excepto al tubo de control de crecimiento. Por último, se agregaron 500 µl de la suspensión bacteriana. El equipo automáticamente interpretó los resultados y reportó los resultados como susceptibles o resistentes, según el caso. El equipo BACTEC MGIT™ 320 continuamente monitoreó los tubos por aumento en la fluorescencia. Para determinar el resultado de la susceptibilidad, se comparó la fluorescencia emitida por el tubo evaluado con el tubo del control de crecimiento.

5.11 GenoType® MTBDRplus 2.0

GenoType® MTBDRplus 2.0 es un método que permite identificar la presencia del CMT en la muestra examinada y las mutaciones más frecuentes asociadas a la resistencia a los medicamentos antituberculosos de primera línea R e H. A diferencia del cultivo, esta prueba puede demorar alrededor de 6 horas, ofreciendo un diagnóstico preliminar. Esta prueba está basada en ensayo de sonda lineal (line probe assay) que involucra PCR e hibridación de los amplicones biotinilados a los oligonucleótidos específicos inmovilizados en una membrana en forma de tira.

Cada tira de ensayo contiene 5 controles: el control de conjugado (CC), control de amplificación (CA) y el control de las zonas de los loci *rpoB*, *katG* e *inhA*. Todas las bandas de control deben estar presentes para la validación del resultado. El CC indica la eficiencia del conjugado para unirse al sustrato, la banda CA indica amplificación de la reacción y ausencia de inhibidores de la muestra. Las zonas de control de los loci *rpoB*, *katG* e *inhA* detectan una región específica para el respectivo locus y deben aparecer cuando la zona de "TUB" está presente. Para caracterizar el aislado evaluado se encuentran 22 sondas en la tira de ADN. TUB representa la región específica del gen rARN 23s perteneciente al CMT; 8 sondas tipo silvestre (WT) comprenden la región del gen *rpoB* que codifica para los aminoácidos 505 a 534 (WT1 a WT8) y 4 sondas son específicas de las mutaciones más comunes: MUT1, MUT2, MUT3 Y MUT4 (D516V, H526Y, H526D, y S531L, respectivamente). En el gen *katG* se encuentran 3 sondas específicas para el codón 315, una corresponde a *katG* WT y dos corresponden a las mutaciones MUT1 (AGC por ACC: S315T1) y MUT2 (AGC por ACA: S315T2). Finalmente, 6 sondas están designadas para la región promotora del gen *inhA* (-8, -15 y -16), dos sondas corresponden a *inhA* WT1 (-15 y -16) y WT2 (-8). Otras 4 detectan mutaciones de C15T (MUT1), A16G (MUT2), T8C (MUT3A) y T8A (MUT3B) (118).

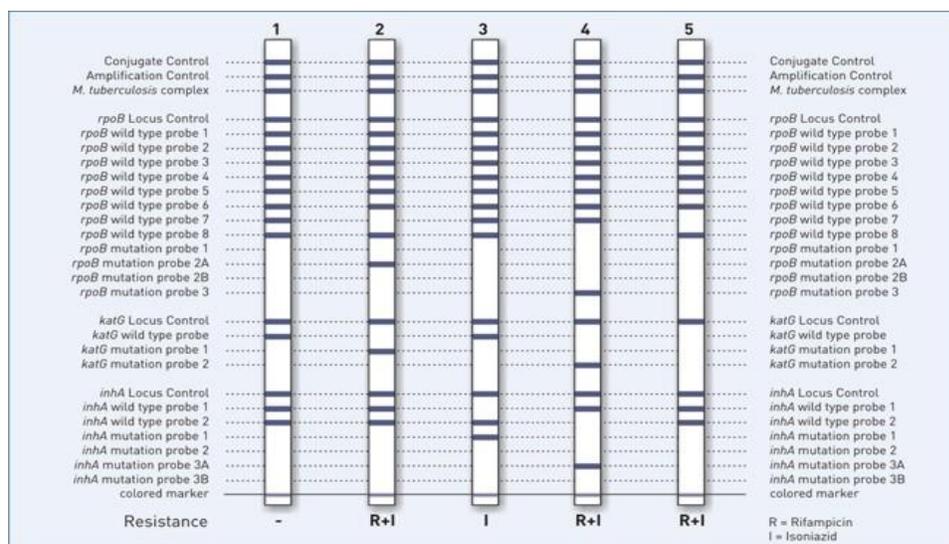
La prueba molecular GenoType® MTBDR*plus* 2.0 se realizó de acuerdo a las instrucciones de manufactura, cambiando el volumen de ADN de 5 µl a 10 µl (GenoType® MTBDR*plus* ver 2.0 instructions for user). El protocolo se realizó de la siguiente manera: Para la amplificación se realizó una mezcla tomando 10 µl del reactivo AM-A y 35 µl AM-B y 10 µl de ADN para un volumen final de 55 µl. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador (Bio Rad C1000) con los siguientes ciclos: 15 minutos de activación de la polimerasa a 95°C, 10 ciclos de denaturación a 95°C durante 30 segundos y elongación a 58°C durante 120 segundos; 3 ciclos de denaturación a 65°C por 2 segundos, anillamiento a 53°C durante 40 segundos y elongación a 70°C durante 40 segundos y una extensión final a 70°C durante 8 minutos.

Los amplicones marcados con biotina fueron hibridados a una sonda complementaria unida a una membrana de nitrocelulosa, para esto se realizó la denaturación de las hebras de ADN durante 5 minutos con el reactivo DEN y se agregó 1ml del buffer de hibridación, esta reacción se llevó a cabo en el equipo TwinCubator® Hain LifeScience GmbH a 42°C durante 30 minutos. Posteriormente, se realizó un lavado con la solución astringente a 42°C durante 15 minutos seguido por un lavado con detergente durante un minuto a temperatura ambiente para eliminar amplicones que no se adhirieron a la membrana. En seguida, se realizó la

adición del conjugado de fosfatasa alcalina-estreptavidina durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavó dos veces con rinse y una con agua destilada cada uno durante un minuto, finalmente se agregó el sustrato del conjugado y la reacción fue evidenciada por la presencia de bandas coloreadas donde el amplicón fue hibridado.

La ausencia de por lo menos una de las bandas WT y/o la presencia de las bandas MUT indican mutación en el gen relacionado indicando resistencia al antibiótico respectivo. Por el contrario, si todas las bandas WT están presentes y no se evidencia ninguna en las regiones de las mutaciones, indica que la muestra evaluada es sensible al antibiótico correspondiente. Para la validación de la prueba es necesario que todas las bandas de los controles se encuentren presentes, de lo contrario la prueba es considerada inválida. En la Figura 8 se muestran ejemplos de los aislados sensibles y resistentes a R y H, con su respectiva guía de lectura.

Figura 8. Lectura de las tiras de GenoType® MTBDRplus 2.0



Tomado de <http://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/tuberculosis/genotype-mtbdplus.html>

Las mutaciones presentes en la tira de GenoType® MTBDRplus 2.0 detectan algunas de las mutaciones más frecuentes responsables de la resistencia a H y R. La ausencia de las bandas WT y/o presencia de las bandas MUT en el gen *rpoB* indican resistencia a R, en el gen *katG* indica resistencia de alto nivel para H y en *inhA*, resistencia de bajo nivel para H. (Tabla 3).

**Tabla 3. Mutaciones en los genes *rpoB*, *katG* e *inhA* detectadas por GenoType®
MTBDRplus 2.0**

Gen <i>rpoB</i>			
Ausencia de banda WT	Codones analizados	Presencia de la banda MUT	Mutación
<i>rpoB</i> WT1	505-509		F505L
			T508A
			S509T
<i>rpoB</i> WT2	510-513		L511P*
			Q513L*
<i>rpoB</i> WT2/WT3	510-517		Q513P
			del514-516
			D516V
<i>rpoB</i> WT3/WT4	513-519	<i>rpoB</i> MUT1	D516Y
			del515
			del518*
<i>rpoB</i> WT4/WT5	516-522		N518I
			S522L
<i>rpoB</i> WT5/WT6	518-525		S522Q
			<i>rpoB</i> MUT2A
<i>rpoB</i> WT7	526-529		H526Y
			<i>rpoB</i> MUT2B
			H526D
			H526R
			H526P*
			H526Q*
			H526N
			H526L
			H526S
			H526C
<i>rpoB</i> WT8	530-533	<i>rpoB</i> MUT3	S531L
			S531Q*
			S531W
			L533P
Gen <i>katG</i>			
Ausencia de banda WT	Codones analizados	Presencia de la banda MUT	Mutación
<i>katG</i> WT	315		<i>katG</i> MUT1
			<i>katG</i> MUT2
S315T1			
S315T2			
Promotor <i>inhA</i>			
Ausencia de banda WT	Posición de ácidos nucleicos analizados	Presencia de la banda MUT	Mutación
<i>inhA</i> WT1	-15		<i>inhA</i> MUT1
			<i>inhA</i> MUT2
A16G	-16		<i>inhA</i> MUT3A
			<i>inhA</i> MUT3B
T8C	-8		T8A
			T8A

WT: Wild Type, MUT: Mutación. * Mutación detectada únicamente *in silico*. Tomado de: GenoType MTBDRplus 2.0 instructions for user.

METODOS PARA CUMPLIR EL OBJETIVO GENERAL Y EL OBJETIVO ESPECIFICO 3 “Determinar los genotipos circulantes de *Mycobacterium tuberculosis* aislados en pacientes VIH positivos de los Hospitales Simón Bolívar y Santa Clara de Bogotá, mediante la técnica de Spoligotyping”.

5.12 GENOTIPIFICACIÓN MOLECULAR POR SPOLIGOTYPING

La genotipificación de cada aislamiento se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Kamerbeek J. y col. La cual consiste en la amplificación del locus DR de cada aislado mediante PCR utilizando los siguientes primers: DRa: 5'-GGTTTTGGGTCTGACGAC y DRb: 5'-CCGAGAGGGGACGGAAAC a una concentración de 20 pmoles cada uno. A diferencia del protocolo original, se utilizó la Platinum™ Taq DNA Polymerase en lugar de la Super Taq DNA polymerase (5000 U) propuesta. Se manejó como control positivo la cepa de referencia H37Rv y como control negativo agua miliQ. El volumen final se realizó a la mitad para minimizar costos, pero conservando las mismas concentraciones. Los volúmenes y concentraciones de los reactivos utilizados para la PCR se muestran en la Tabla 4. La amplificación por PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo a 96°C por 3 minutos, 20 ciclos a 96°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 30 segundos y un paso final de extensión a 72°C por 5 minutos.

Tabla 4. Mezcla maestra de PCR para amplificación de DR

Reactivo	Concentración Final	Volumen
Agua MQ		14.2 µl
Buffer	10X	2.5 µl
MgCl ₂	1,5 mM	0,75 µl
dNTPs	2,5 mM	2 µl
PRIMER DRa*	20 pmol	2 µl
PRIMER DRb	20 pmol	2 µl
Taq Platinum®	0,04 units/µl	0,05 µl
TOTAL MEZCLA		23,5 µl
ADN		1,5 µl
VOLUMEN TOTAL		25 µl

* Primer marcado con biotina.

Posteriormente, los productos de PCR obtenidos fueron hibridados a una membrana comercial (Ocimum Biosolutions BV) de primera generación que contiene 43 oligonucleotidos correspondientes a 43 secuencias espaciadoras del locus DR del *M tuberculosis* (108). El resultado de la hibridación se evidenció

mediante quimioluminiscencia empleando el estuche comercial Novex ECL Chemiluminescent Substrate Reagent (Kit. Set 2x125ml. Marca INVITROGEN) y se reveló mediante exposición a una película fotosensible SHEETS Thermo Scientific™ Pierce™ CL Xposure film (18x24cm) en el equipo revelador Energex modelo SRX-101A. El procedimiento general se describe en el Anexo 3. La lectura de la membrana se realizó visualmente. La detección de las 43 secuencias espaciadoras se determinó con la presencia o la ausencia de un punto en el lugar correspondiente. Con los resultados obtenidos se estableció un código binario de 43 dígitos, donde “1” correspondió a la presencia de la secuencia espaciadora y “0” a la ausencia de la misma.

La información obtenida de los diferentes patrones de genotipificación obtenidos por Spoligotyping se analizaron utilizando la base de datos SITVIT disponible en: <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/> y las bases de datos mundiales SpolDB4 (92). y. Para el análisis de clusters se utilizó en la página MIRU-VNTRplus junto con el método de UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average), el cual agrupó los patrones de acuerdo a sus coeficientes de similitud para posteriormente construir el respectivo dendograma. De esta manera, se determinaron los patrones en Cluster (infección reciente) y/o patrones únicos indicativos de reactivación endógena.

METODOS PARA CUMPLIR EL OBJETIVO GENERAL Y EL OBJETIVO ESPECIFICO 4. “Determinar el porcentaje de cepas agrupadas y aislados únicos de *Mycobacterium tuberculosis* obtenidos de pacientes VIH positivos de los Hospitales Simón Bolívar y Santa Clara de Bogotá, mediante la técnica de MIRU VNTR de 24 loci”.

5.13 GENOTIPIFICACIÓN MOLECULAR POR MIRU DE 24 LOCI

La genotipificación molecular por MIRU-VNTR 24 loci de cada aislado clínico se realizó de acuerdo a la metodología propuesta en la guía técnica por Supply P. y col., 2005 (119). Para este procedimiento se utilizó un set de 24 pares de primers correspondientes a los loci MIRU (locus 154, 424, 577, 580, 802, 960, 1644, 1955, 2059, 2163b, 2165, 2347, 2401, 2461, 2531, 2687, 2996, 3007, 3171, 3192, 3690, 4052, 4156 y 4348) (119) (Tabla 5). Cada primer fue diseñado tomando las regiones flanqueantes de cada locus analizado. La estandarización se realizó con la cepa control de referencia H37Rv, y dos aislados del estudio. Los primers se usaron a concentraciones diferentes a las propuestas por la guía técnica (Anexo 4) y para

minimizar los costos se realizó a la mitad del volumen sugerido. De esta manera se realizaron 24 PCRs por cada aislado clínico iniciando con un paso de denaturación de 15 minutos a 95°C, seguida por 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C, y 1 minuto 30 segundos a 72°C, terminando la reacción con 10 minutos a 72°C a excepción del locus 4052 (QUB-26), en la cual la temperatura de anillamiento se realizó a 59°C.

Los productos amplificados fueron evidenciados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE a 1X, utilizando un marcador de peso molecular de 1Kb a cada extremo del gel para su interpretación. La visualización de los productos de PCR se realizó en el analizador y fotodocumentador de geles (Bio Imagen System modelo ChemiGenius, y el peso molecular de cada fragmento se determinó automáticamente mediante el software GeneSnap® versión 6.07 GeneTools. Los valores de peso molecular fueron almacenados en Microsoft Excel®. Las bandas correspondientes de cada MIRU-VNTR se interpretaron como el número de copias en base a una tabla de referencia (Laboratorio de Referencia e Investigación del Instituto Pasteur de Guadeloupe) mostrada en el Anexo 5 (119). Finalmente, se obtuvo un código numérico correspondiente al número de repeticiones por locus, el cual es ingresado a las bases de datos SITVIT WEB y MIRU-VNTRplus para su análisis.

Los patrones obtenidos mediante spoligotyping y MIRU-VNTR se compararon con aquellos reportados en la base de datos SpolDB4 (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/) de libre acceso propiedad del Instituto Pasteur de Guadeloupe (91). Para indicar los SITs y los linajes genéticos de CMT se utilizaron las herramientas disponibles en la página web MIRU-VNTRplus (www.miruvntrplus.org) (120). Basados en estas dos técnicas se construyeron dendogramas para determinar los cluster moleculares de los aislados. Un cluster fue definido como dos o más aislados que compartieron patrones idénticos, mientras que los patrones que no coincidieron con ninguno de la base de datos se denominaron “huérfanos”. El Índice Discriminatorio de Hunter y Gaston (HGDI) fue usado para calcular el poder discriminatorio relativo de cada método (121). Los casos en donde se encontraron dobles alelos en uno o más loci VNTR sugestivos de genotipos mixtos que podrían indicar infección mixta o contaminación (122), fueron reevaluados.

Tabla 5. Primers para amplificación de MIRU-VNTR 24 loci.

Locus	Alias	Tamaño de repetición en pb	PCR primer pairs (5' to 3')
580	MIRU 4	77	GCGCGAGAGCCCCGAAGTGC GCGCAGCAGAAACGCCAGC
2996	MIRU 26	51	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCGAATAG
802	MIRU 40	54	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA
960	MIRU 10	53	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT
1644	MIRU 16	53	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCCTCGTGCAGCCCTGGTAC
3192	MIRU 31	53	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT
424	42	51	CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT GGCAGCAGAGCCCGGATTCTTC
577	43	58	CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA
2165	ETR A	75	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT CGAAGCCTGGGGTGCCCGCATTT
2401	47	58	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT ACTTGAACCCCCACGCCCATAGTA
3690	52	58	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG
4156	53	59	TGACCACGGATTGCTCTAGT GCCGGCGTCCATGTT
2163b	QUB-11b	69	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGGCAT
1955	Mtub21	57	AGATCCCAGTTGTCGTCGTC CAACATCGCCTGGTTCTGTA
4052	QUB-26	111	AACGCTCAGCTGTCGGAT CGGCCGTGCCGGCCAGGTCCTTCCCGAT
154	MIRU 2	53	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT
2531	MIRU 23	53	CTGTCGATGGCCGCAACAAAACG AGCTCAACGGGTTGCCCTTTTGTG
4348	MIRU 39	53	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT
2059	MIRU 20	77	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA
2687	MIRU 24	54	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA
3007	MIRU 27	53	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA
2347	46	57	GCCAGCCGCCGTGCATAAACCT AGCCACCCGGTGTGCCTTGTATGAC
2461	48	57	ATGGCCACCCGATACCGCTTCAGT CGACGGGCCATCTTGGATCAGCTAC
3171	49	54	GGTGCGCACCTGCTCCAGATAA GGCTCTCATTGCTGGAGGGTTGTAC

Tomado de la guía técnica Supply P. y col., 2005 (119)

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y EPIDEMIOLÓGICA DE LOS PACIENTES.

Durante el estudio se captaron 356 pacientes quienes se encontraban hospitalizados o asistían a consulta externa en los hospitales Simón Bolívar y Santa Clara de la ciudad de Bogotá y cumplieron con los criterios de inclusión, ingresaron al estudio por voluntad propia y firmaron el consentimiento informado. No se presentó ningún evento adverso.

Del total de pacientes captados, 36/356 (10,1%) pacientes tuvieron cultivo positivo para complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

En la tabla 6, se observan las características demográficas de los pacientes positivos para *M. tuberculosis* obtenidos.

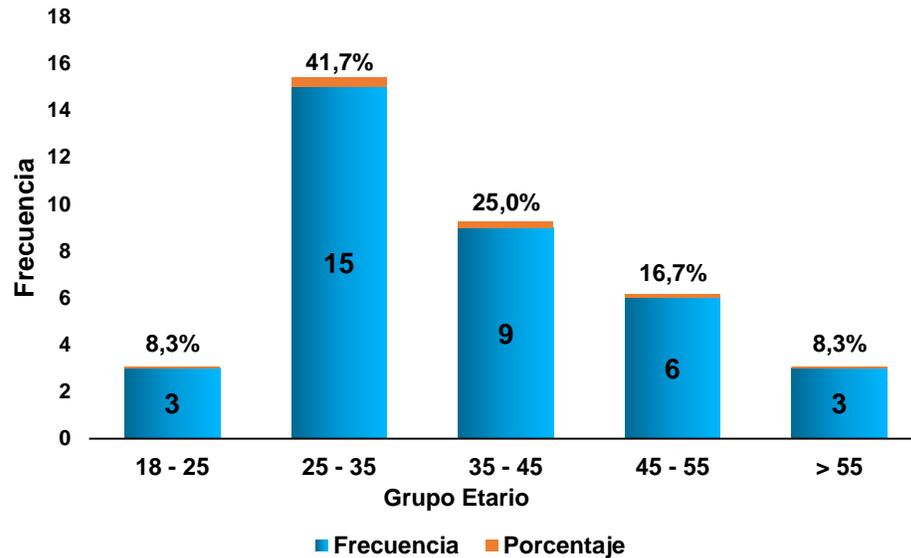
Tabla 6. Caracterización demográfica de los pacientes VIH positivos estudio

Caracterización demográfica de la población en estudio (n = 36)			
Variables		TOTAL	
		Frecuencia	%
Hospital	Simón Bolívar	17	47,2
	Santa Clara	19	52,8
Sexo	Femenino	8	22,2
	Masculino	28	77,8
SGSSS	Régimen subsidiado	26	72,2
	Vinculado - SISBEN	10	27,8
Servicio	Hospitalizado	34	94,4
	Consulta externa	2	5,6
Raza	Blanco	3	8,3
	Indígena	1	2,8
	Mestizo	32	88,9
Lugar de residencia	Habitante de calle	10	27,8
	Privado de la libertad	1	2,8
	Casa	26	72,2

La edad promedio del diagnóstico de VIH fue de 33,7 años. La relación hombre mujer fue de 3,5:1; con una media de edad de 36,8 años (rango 18-61 años). El

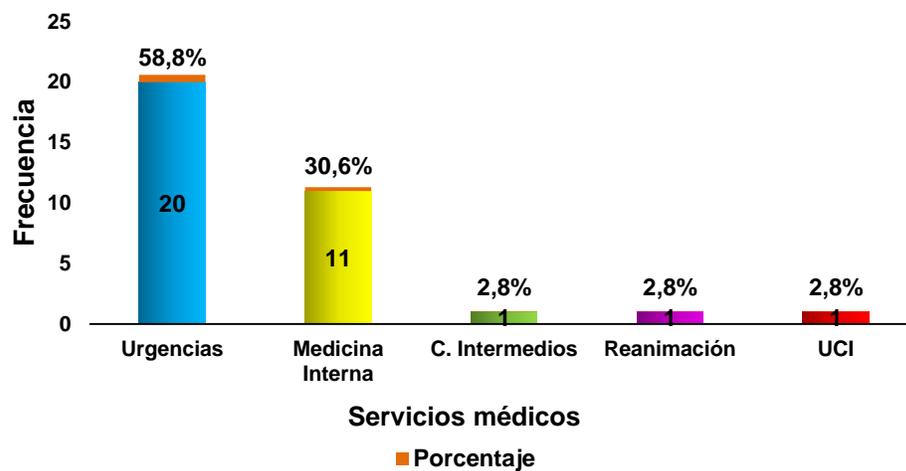
grupo etario donde hubo mayor número de participantes fue entre 25 y 35 años de edad con un 41,7%. Figura 9.

Figura 9. Edad de los pacientes infectados con TB



Los servicios de hospitalización donde más se captaron pacientes fueron urgencias y medicina interna, como se relaciona en la Figura 10.

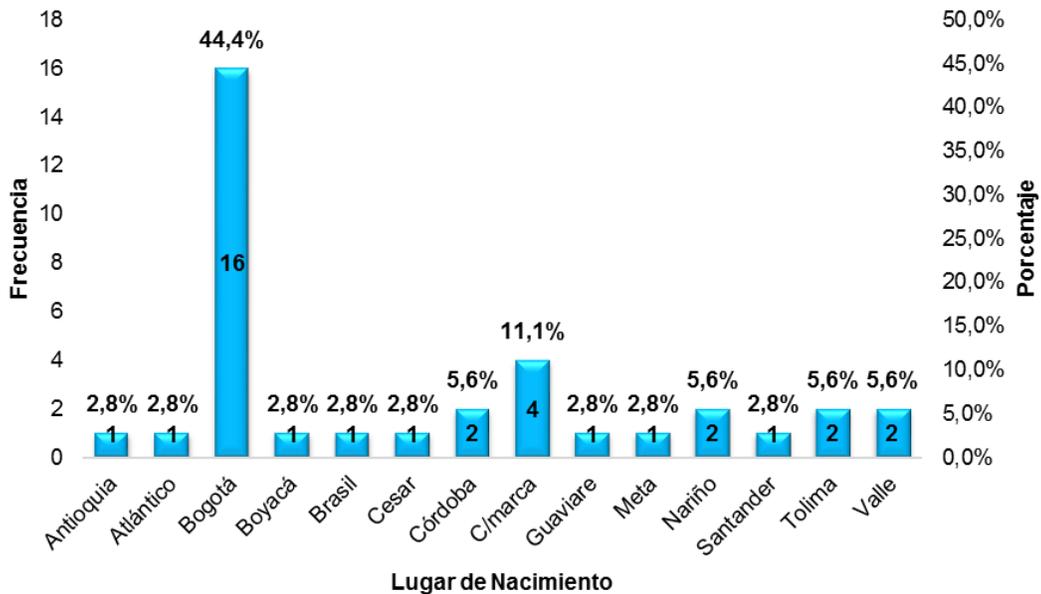
Figura 10. Servicios de hospitalización donde se captaron los pacientes.



El 44,4% (16/36) de los pacientes eran oriundos de la ciudad de Bogotá, los demás pacientes procedían de diferentes lugares del país. Uno (2,8%) provenía de Brasil

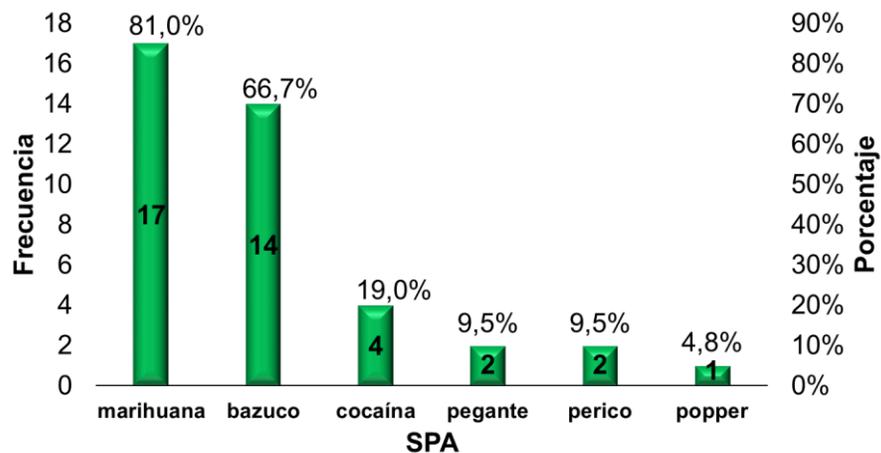
y un (2,8%) paciente nació en Cesar, pero provenía de Venezuela. (Figura 11); 3/36 (8,3%) de ellos, refirieron estar en situación de desplazamiento forzado.

Figura 11. Lugar de nacimiento de los pacientes.



De los pacientes coinfectados VIH/TB 21/36 (58,3%) consumía sustancias psicoactivas (SPA), las sustancias de mayor consumo se explican en detalle en la figura 12. 13/36 (36,1%) individuos fuman cigarrillo y 22/36 (61,1%) consumen bebidas alcohólicas.

Figura 12. Sustancias psicoactivas consumidas



Adicionalmente, se obtuvo información de carga viral y recuento de linfocitos T CD4+ en 28/36 (77,7%) pacientes. En cuanto a carga viral se refiere, los rangos hallados fueron de 20 a 2'022.010 copias con una media de 393.427 copias y el rango de linfocitos T CD4+ fue de 3 a 660 cel/ μ l con una media de 109 cel/ μ l. El 92,9% de los pacientes tenían menos de 250 linfocitos T CD4+/ μ l. Las características clínicas de la población de estudio, se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Características clínicas de los pacientes VIH positivos en estudio

Variables		Características clínicas	
		TOTAL	
		n=36	%
Indice de Masa Corporal (IMC)	> 18,5 kg/m ²	20	55,6
	< 18,5 kg/m ²	16	44,4
CD4+*	<50 cel/ μ l	12	44,4
	50-250 cel/ μ l	12	44,4
	>250 cel/ μ l	3	11,1
Terapia antiretroviral	No	27	75
	Si	9	25
Coinfecciones	No	13	36,1
	Si	23	63,9
BCG	No	6	16,7
	Si	30	83,3
Antecedentes TB	No	24	66,7
	Si	12	33,3
Tuberculina previa	No	28	77,8
	Si	8	22,2
Radiografía de tórax	No	14	38,9
	Si	22	61,1
Diabetes	No	35	97,2
	Si	1	2,8
Sarcoma de Kaposi	No	33	91,7
	Si	3	8,3
Falleció	No	26	72,2
	Si	10	27,8

* Para la variable CD4+ el total de la población es 27

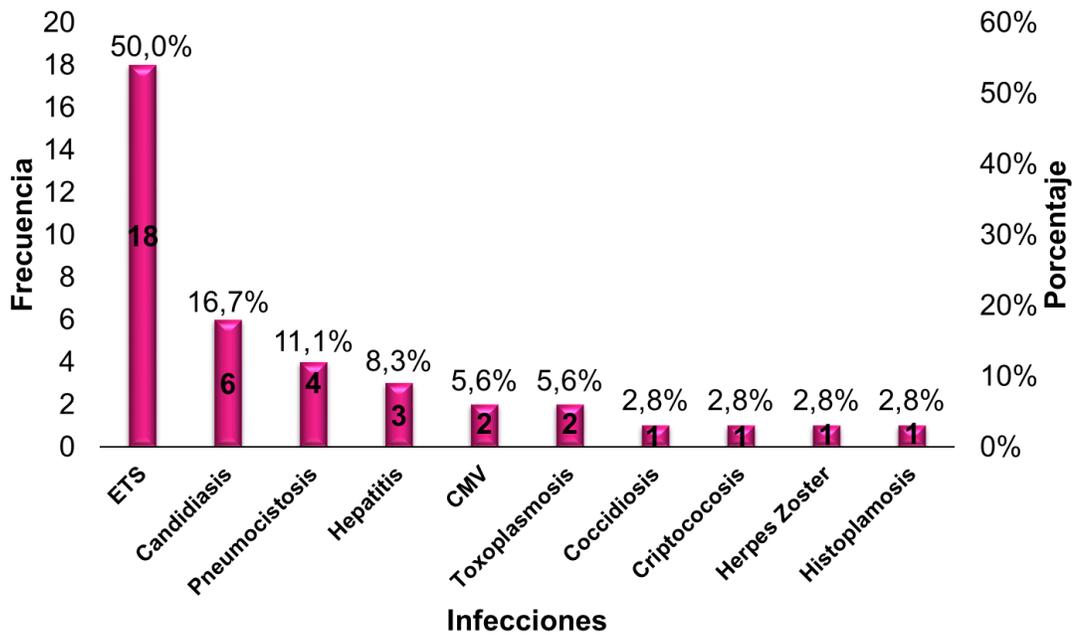
Las principales razones por la cuales los pacientes no tomaban TARGA fueron: problemas con la EPS, 7/27 (25,9%); análisis previos para dar inicio al tratamiento 4/27 (14,8%) y situación en condición de calle y drogodependencia 4/27 (14,8%).

De acuerdo al resultado de las radiografías de tórax, 8/22 (36,4%) tuvieron un resultado compatible con TB, 12/22 (54,6%) tuvieron otros resultados no compatibles con TB y 2/22 (9,1%), resultados normales.

Del total de los pacientes incluidos en el estudio, 12/36 (33,3%) tenían antecedentes de TB. De ellos, 10/12 pacientes (83,3%) iniciaron tratamiento, pero solamente 4/10 (40%) lo terminaron. Los demás fueron considerados como abandono.

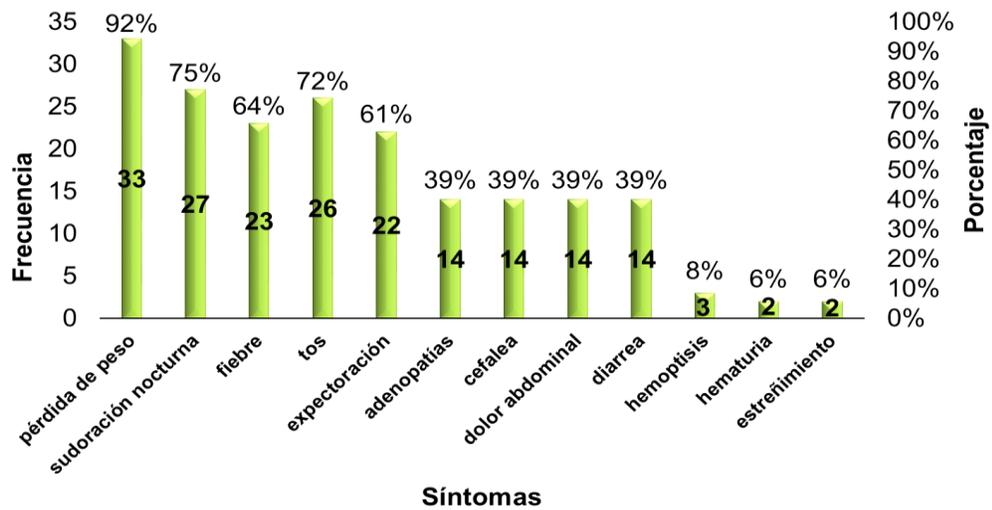
Las enfermedades infecciosas más frecuentes padecidas previamente en la población se describen en la figura 13. Las ETS reportadas fueron sífilis, 66,7% (12/18); uretritis gonocócica, 38,9% (7/18); Herpes tipo II, 11,1% (2/18) y condilomas, 11,1% (2/18).

Figura 13. Frecuencia de otras coinfecciones en la población de estudio



Los síntomas presentes en los pacientes al momento del ingreso al estudio se muestran en detalle en la figura 14.

Figura 14. Síntomas presentes en los pacientes coinfectados VIH/TB



En total se procesaron 49 aislados de *M. tuberculosis* correspondientes a 36 pacientes, en 13/36 (36,1%) pacientes se aisló *M. tuberculosis* en dos muestras diferentes y 23/36 (63,9%) en una sola. Del paciente N° 25 se obtuvo una muestra de esputo en diciembre de 2014 y posteriormente una muestra de secreción de absceso de psoas en septiembre de 2015 y del paciente N° 27 se obtuvo una muestra de esputo en febrero de 2015 y una de secreción cervical en julio del mismo año (Tabla 8). El 67,3% (33/49) de la TB ocurrió a nivel pulmonar y el 32,7% (16/49) fue extrapulmonar (Figura 15).

Figura 15. Frecuencia de TB según fuente de aislamiento

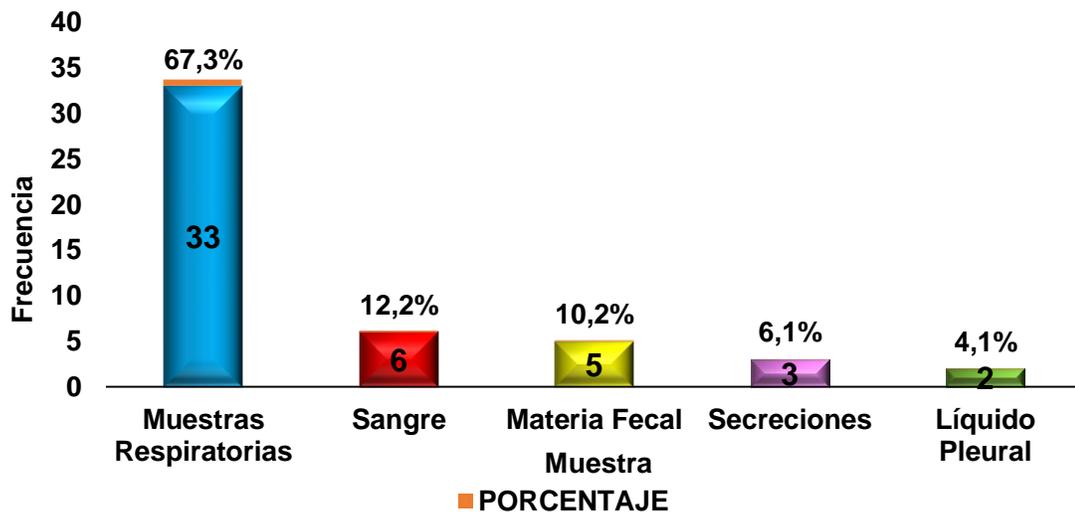


Tabla 8. Formas Clínicas de TB en los Pacientes VIH positivos en estudio

Paciente	Forma Clínica	Tipo de Muestra	N° Muestra	Baciloscopia Positiva	Cultivo Positivo
1	Pulmonar	Esputo	3	1	1
2	Extrapulmonar	M. fecal	1	0	1
3	Pulmonar y	E.I.	1	0	1
	Extrapulmonar	M. fecal	1	0	1
4	Pulmonar	Esputo	3	0	1
5	Pulmonar	Esputo	3	0	1
6	Pulmonar	Esputo	3	1	1
7	Pulmonar	Esputo	1	1	1
8	Pulmonar	E.I.	1	0	1
9	Diseminada	E.I.	1	1	1
		Sangre	2	1	2
10	Diseminada	Esputo	1	0	1
		Sangre	2	2	2
11	Pulmonar	Esputo	1	0	1
12	Diseminada	Esputo	1	1	1
		Sangre	2	1	2
13	Pulmonar y Extrapulmonar	E.I.	1	0	1
		M. fecal	1	0	1
14	Pulmonar y Extrapulmonar	Esputo	3	3	1
		M. fecal	1	1	1
15	Diseminada	Esputo	3	0	1
		Sangre	2	2	2
16	Pulmonar y Extrapulmonar	Esputo	3	0	1
		M. fecal	1	0	1
17	Pulmonar	Esputo	3	2	1
18	Pulmonar	Esputo	3	3	1
19	Pulmonar	Esputo	1	1	1
20	Pulmonar	Esputo	1	1	1
21	Extrapulmonar	L. Pleural	1	0	1
22	Pulmonar	Esputo	1	0	1
23	Pulmonar	Esputo	1	1	1
24	Pulmonar	E.I.	1	1	1
25	Diseminada	Esputo	1	1	1
		S. Psoas	1	1	1
26	Pulmonar	Esputo	1	0	1
27	Diseminada	Esputo	1	1	1
		S. Cervical	1	1	1
28	Diseminada	E.I.	1	1	1
		Sangre	1	2	1
29	Extrapulmonar	L. Pleural	1	0	1
30	Diseminada	Esputo	3	3	1
		S. Cervical	1	1	1
31	Pulmonar	Esputo	3	0	1
32	Diseminada	LBA	1	1	1
		sangre	2	2	1
33	Pulmonar	Esputo	3	0	1
34	Pulmonar	Esputo	3	3	1
35	Pulmonar	LBA	1	1	1
36	Pulmonar	Esputo	3	1	1

E.I.: Esputo Inducido; M. fecal: Materia fecal; L. pleural: Líquido pleural; S. psoas: Secreción absceso de psoas; S. cervical: Secreción cervical; LBA: Lavado broncoalveolar. El 36,1% de los pacientes tuvieron TB diseminada, con predominio de bacteremia (46,2%)

En cuanto a la tasa de mortalidad se tuvo que los 36 pacientes aportaron un total de seguimiento de 424 meses. Con una mediana de seguimiento de 12.8 meses. El tiempo mínimo de seguimiento fue de 0,13 meses y el máximo de 17.2 meses. No fue posible estimar la mediana de supervivencia porque solo el 30% presentaron desenlace muerte. La tasa de mortalidad para esta muestra fue de 2,36 muertes/100 pacientes al mes (IC: 95% 1,3 a 4,4).

6.2 PATRONES DE SUSCEPTIBILIDAD A MEDICAMENTOS ANTITUBERCULOSOS DE PRIMERA LÍNEA EN LOS AISLADOS CLÍNICOS DE *M. tuberculosis* OBTENIDOS

En total, 49 (100%) aislados de CMT fueron evaluados por el método fenotípico BACTEC™ MGIT™ SIRE y el método molecular Genotype® MTBDRplus 2.0. Por el método fenotípico, 1/49 (2%) fue resistente a R y 2/49 (4%) monoresistentes a H, estos dos aislados, correspondieron a un paciente que ingresó al hospital Santa Clara en dos ocasiones. Por el método molecular Genotype® MTBDRplus 2.0, el 100% de los aislados fueron sensibles a H, y 3/49 (5,9%) fueron resistentes a R. Las monorresistencias y mutaciones encontradas en los aislados se relacionan en la Tabla 9.

Tabla 9. Monorresistencias y mutaciones en los aislados de *M. tuberculosis*

Paciente	Muestra	Genotype® MTBDRplus 2.0		BACTEC MGIT™ SIRE™			
		H	R	H	R	S	E
1	Espuito*	S	R (Ausencia del WT4-codones 513-519)	R	S	S	S
	Secreción** psoas	S	R (Ausencia del WT4-codones 513-519)	R	S	S	S
2	Espuito	S	R (Ausencia del WT8-codones 530-533)	S	R	S	S

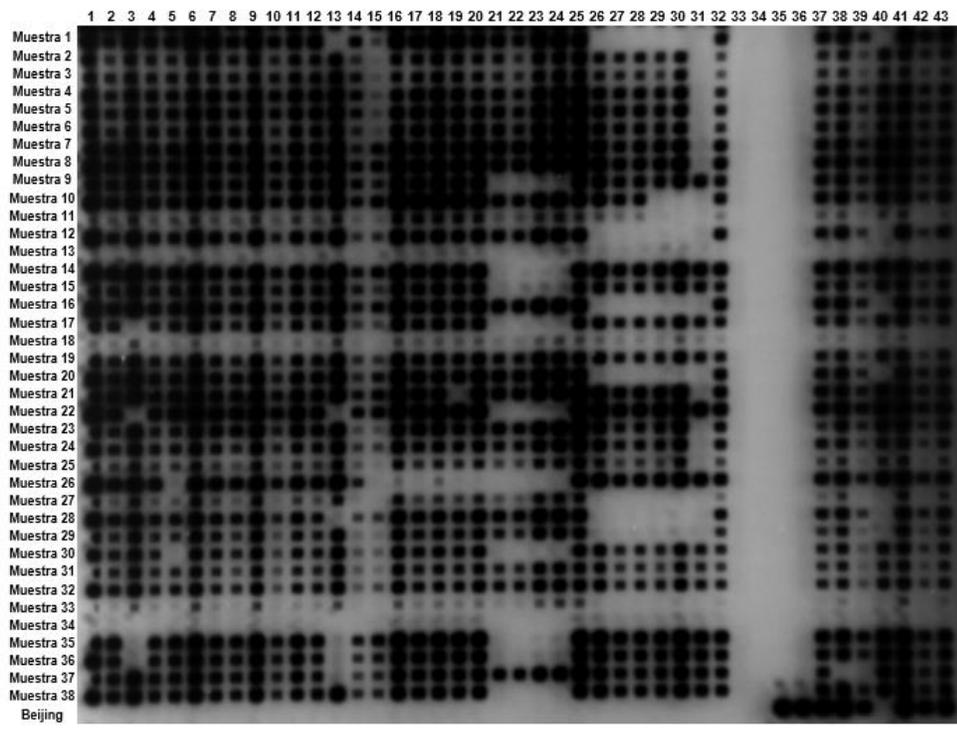
S: Susceptible, R: Resistente. El esputo fue tomado en octubre del 2014. ** La Secreción de absceso de psoas fue tomada en septiembre del 2015.

6.3 GENOTIPIFICACIÓN MOLECULAR DE *Mycobacterium tuberculosis* POR SPOLIGOTYPING

La membrana del spoligotyping puede reutilizarse alrededor de 10 veces; en este estudio se utilizó la misma membrana para todos los aislados y repeticiones. En

cada membrana se pueden estudiar hasta 45 aislados. En la figura 16, se observa la hibridación ocurrida, horizontalmente se encuentran enumerados los oligonucleótidos y verticalmente se encuentran las muestras procesadas.

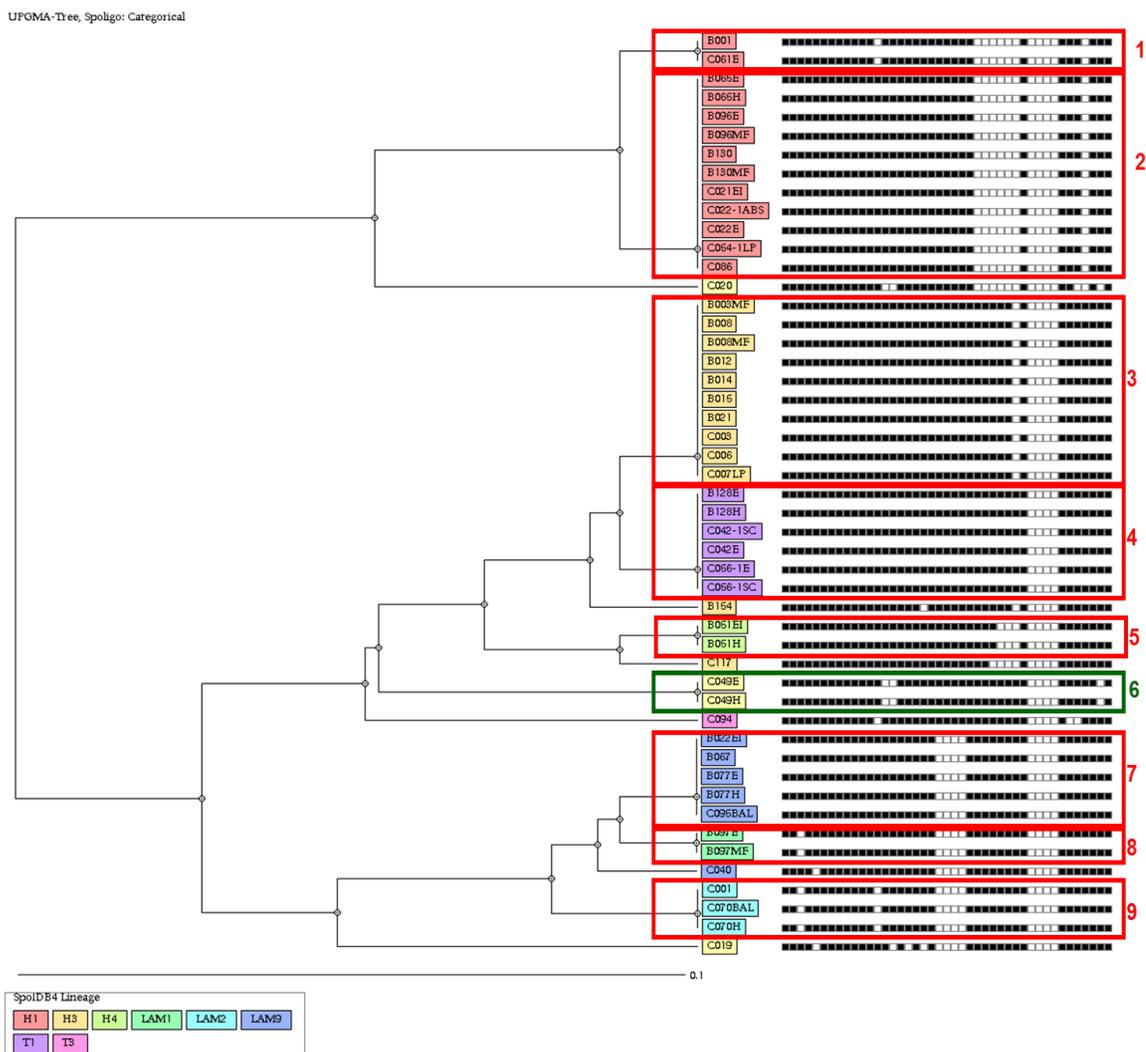
Figura 16. Membrana de spoligotyping



El spoligotyping fue realizado a 49 aislados obtenidos en el estudio. Por esta metodología se pudo confirmar que el 100% de los aislados correspondieron dentro del CMT a *Mycobacterium tuberculosis* (49/49).

Se identificaron en total 15 patrones espoligotipo diferentes, de los cuales 4/49 (6,1%) aislados fueron huérfanos y 45/49 (91,8%) pertenecían al linaje Euro Americano; 8 corresponden a tipos compartidos de SITs e incluyen 41 aislados (2 – 11 aislados/cluster) con una tasa de agrupamiento de 83,7% y 4/49 (8%) patrones tuvieron SITs asignados en la base de datos SITVIT2, pero fueron únicos en nuestro estudio. (Figura 17)

Figura 17. Identificación de los patrones SIT obtenidos por spoligotyping.



Los clusters marcados en rojo se encuentran en la base de datos SITVIT2. El cluster enmarcado en verde corresponde a un patrón huérfano.

Distribución de cepas en el Linaje Euro Americano:

- Sub-linaje Haarlem: a este sub-linaje pertenecieron 27/49 (55%) aislados, distribuidos así: H1, 13/49 (26,5%); H3, 12/49 (24,5%) y H4, 2/49 (4,1%)
- Sub-linaje LAM: a este sub-linaje pertenecieron 11/49 (22%) aislados, distribuidos así: LAM9, 6/49 (12,2%); LAM2, 3/49 (6,1%); LAM1, 2/49 (4,1%)
- Sub-linaje T: a este sub-linaje pertenecieron 7/49 (14%) aislados distribuidos así: T1, 6/49 (12,2%) y T3, 1/49 (2%). Figura 18.

El cluster más grande correspondió a SIT62/Haarlem 1 (n=11), seguido por SIT50/Haarlem 3 (n=10), SIT53/T1 (n=6) y SIT42/LAM9 (n=5). (Tabla 10).

Figura 18. Sublinajes (familias) de los aislados de *M. tuberculosis*

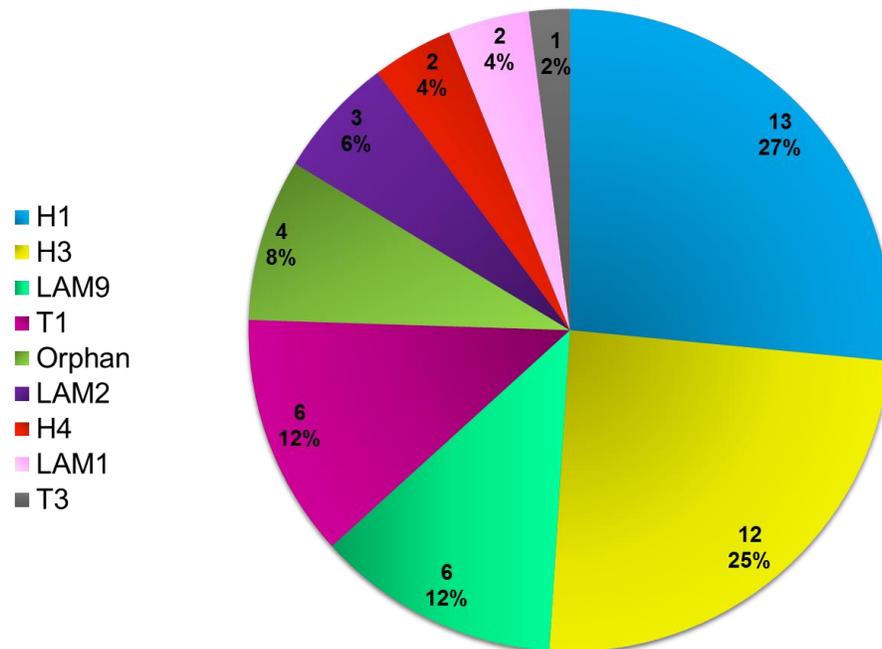


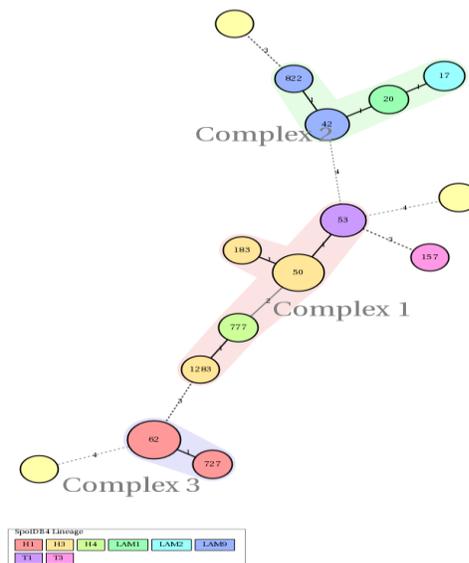
Tabla 10. Frecuencia de SITs obtenidos

N° Cluster	SITs	N° Cepas agrupadas	Porcentaje
1	727 / H1	2	4,1%
2	62 / H1	11	22,4%
3	50 / H3	10	20,4%
4	53 / T1	6	12,2%
5	777 / H4	2	4,1%
6	Huérfanos	2	8,2%
7	42 / LAM9	5	10,2%
8	20 / LAM1	2	4,1%
9	17 / LAM2	3	6,1%
Único	183 / H3	1	2,0%
Único	822 / LAM9	1	2,0%
Único	1283 / H3	1	2,0%
Único	157 / T3	1	2,0%
Único	Huérfanos	1	2,0%
Único	Huérfanos	1	2,0%
TOTAL		49	100,0%

SIT: código spoligo internacional, LAM: Linaje Latinoamericano y Mediterraneo, H: Linaje Haarlem, Huérfano: no descrito en la base de datos SPOLDB4.

Un árbol de expansión mínima (MSTs-Minimum spanning trees) se construyó basado en los patrones spoligotyping, se evidenciaron 3 grupos, el primer grupo incluyó los SITs 50/H3, 53/T1, 777/H4, 1283/H3 y 183/H3. El segundo grupo comprende los SITs 822/LAM9, 42/LAM9, 20/LAM1 y 17/LAM2 y el tercer grupo los SITs 62/H1 y 727/H1, como se muestra en la figura 19. Hubo mayor distancia entre los linajes Haarlem que entre los linajes LAM.

Figura 19. Árbol de mínima expansión (MST) basado en los patrones de spoligotyping



En esta figura se determina la distancia filogenética entre las cepas estudiadas, y se agrupan de acuerdo a su similitud entre ellas, en la cual se evidenciaron 3 grupos principales.

* El árbol filogenético conecta cada genotipo basado en el grado de cambios requeridos para ir de un alelo a otro. La estructura de los árboles representada por ramas (líneas continuas vs líneas punteadas) y círculos representando cada patrón individual. El tamaño de la rama representa la distancia entre los patrones, los trazos de las líneas indican el cambio en el número de alelos/espaciadores entre dos patrones. Las líneas sólidas indican de 1 a 3 cambios (la más gruesa indica 1 solo cambio, las más delgadas indican 2 o 3 cambios), las líneas interrumpidas indican 4 cambios. El tamaño del círculo muestra el número de aislados. El color del círculo indica el linaje filogenético al cual el patrón pertenece. Las etiquetas de los nodos indican los SITs respectivo. Los nodos sin SITs corresponde a los huérfanos.

6.4 GENOTIPIFICACIÓN DE *M. tuberculosis* USANDO LA METODOLOGÍA MIRU-VNTR

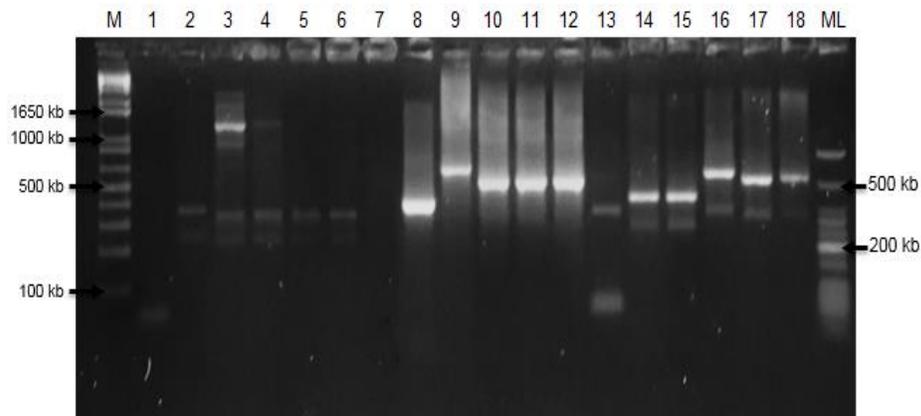
6.4.1 Estandarización de la PCR de acuerdo a las condiciones del laboratorio.

Las genotipificación por MIRU-VNTR se realizó como se mencionó previamente, se tuvo como referencia la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, que se sembró en el

segundo carril de cada serie de MIRU evaluado. El tamaño de los productos de PCR varían de acuerdo al número de copias de MIRU presente en cada aislado. Las figuras 20 a 27 muestran los diferentes patrones obtenidos en cada locus. La figura 28, muestra una infección policlonal que se presentó en una muestra.

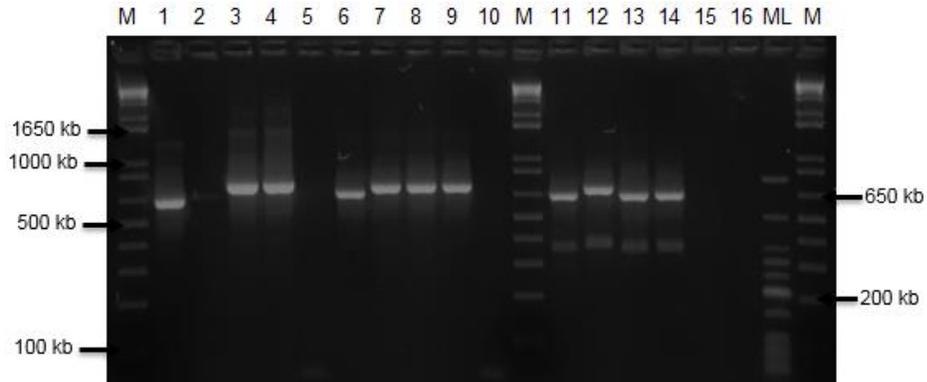
Algunos de los loci evaluados tienen como característica presentar los denominados “stutters”, los cuales son productos artefactuales del deslizamiento de la polimerasa en zonas del genoma que contienen repeticiones cortas concatenadas, como las que se presentan en el locus MIRU-VNTR de *M. tuberculosis*. Estos productos artefactuales se pueden distinguir del tamaño correcto de amplificación del locus, porque generan una escalera descendente de bandas de amplificación de menor intensidad, las cuales corresponden a fragmentos de PCR que pierden uno o más repeticiones (119)

Figura 20. Amplificación de los loci MIRU 4, MIRU 26 y MIRU 40



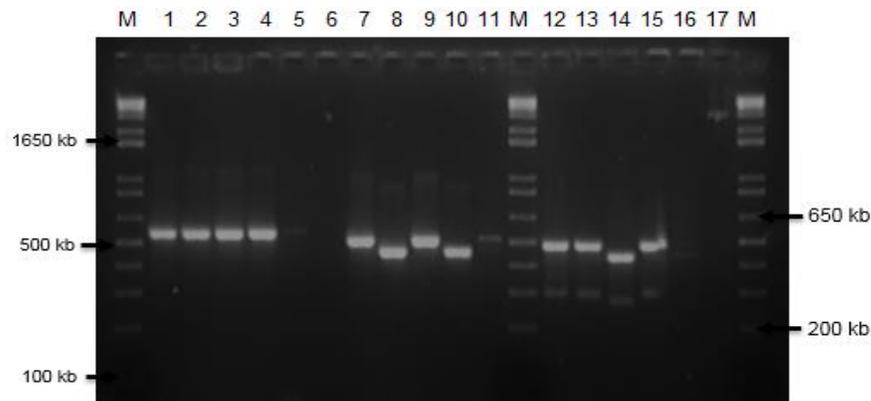
M: Marcador de peso molecular de 1 KB. **Carril 1:** Control negativo. **Carriles 2-7 MIRU 4.** **Carril 2:** Cepa control H37Rv, Peso Molecular (PM): 400 pb, 3 copias MIRU; **Carril 3:** Cepa Control 323, PM: 1266 pb, 14 copias MIRU; y PM: 332 pb, 2 copias; **Carril 4:** Cepa B001, **Carril 5:** Cepa B003M, **Carril 6:** Cepa B003M, PM: 362 pb, 2 copias MIRU cada uno; **Carril 7:** Cepa B008, PM: no amplificó. **Carriles 8-13 MIRU 26.** **Carril 8:** Cepa control H37Rv, PM: 445 pb, 3 copias MIRU; **Carril 9:** Cepa Control 323, PM: 619 pb, 6 copias MIRU; **Carril 10:** Cepa B001, **Carril 11:** Cepa B003M, **Carril 12:** Cepa B003M, PM: 505 pb, 4 copias MIRU cada uno; **Carril 13:** cepa B008, PM: 445 pb, 3 copias MIRU. **Carriles 14-18 MIRU 40.** **Carril 14:** Cepa control H37Rv PM: 408 pb, 1 copia MIRU; **Carril 15:** Cepa Control 323, PM: 408 pb, 1 copia MIRU; **Carril 16:** Cepa B001, PM: 530 pb, 3 copias MIRU; **Carril 17:** Cepa B003M, PM: 513 pb, 3 copias MIRU; **Carril 18:** Cepa B003M, PM: 513 pb, 3 copias MIRU. **ML:** Marcador de peso molecular de bajo peso.

Figura 21. Amplificación de los loci MIRU 10, MIRU 16 y MIRU 31



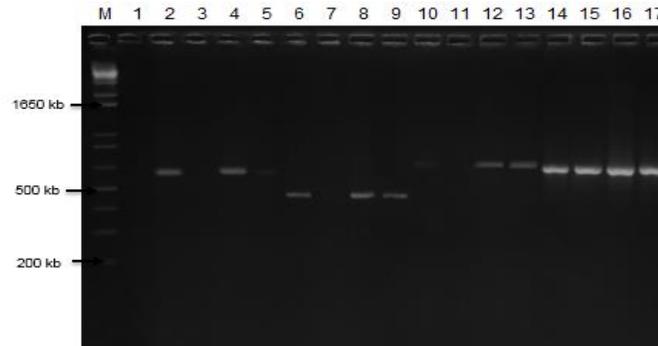
M: Marcador de peso molecular de 1 KB. **Carriles 1-5 MIRU 10.** **Carril 1:** Cepa control H37Rv Peso Molecular (**PM**): 640 pb, 3 copias MIRU; **Carril 2:** Cepa control 323, **PM**: 652 pb, 3 copias MIRU; **Carril 3:** Cepa B001, **PM**: 720 pb, 5 copias MIRU; **Carril 4:** Cepa B003M, **PM**: 720 pb, 5 copia MIRU; **Carril 5:** Cepa B008, **PM**: amplificación muy leve. **Carriles 6-9 MIRU 16.** **Carril 6:** Cepa control H37Rv **PM**: 675 pb, 2 copias MIRU; **Carril 7:** Cepa Control 323, **Carril 8:** Cepa B001, **Carril 9:** Cepa B003M, **PM**: 725 pb, 3 copias MIRU cada uno. **Carril 10:** vacío. **Carriles 11-14 MIRU 31.** **Carril 11:** Cepa control H37Rv **PM**: 650 pb, 3 copias MIRU; **Carril 12:** Cepa Control 323, **PM**: 665 pb, 3 copias MIRU; **Carril 13:** Cepa B001 **PM**: 652 pb, 3 copias MIRU; **Carril 14:** Cepa B003M, **PM**: 652 pb, 3 copias MIRU. **Carril 15:** Control negativo **Carril 16:** vacío.

Figura 22. Amplificación de los loci VNTR 46, VNTR 48 y VNTR 49



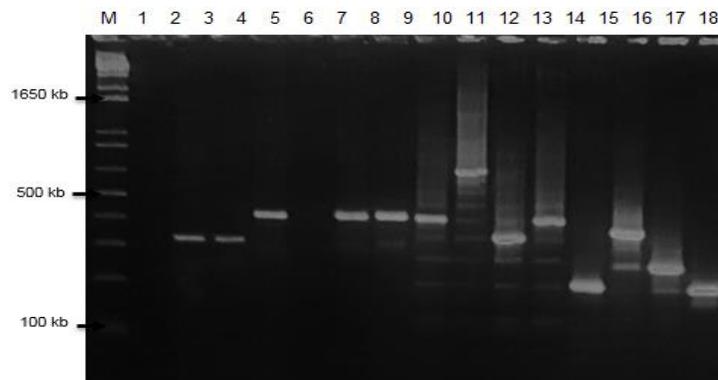
M: Marcador de peso molecular de 1 KB. **Carriles 1-5 VNTR 46.** **Carril 1:** Cepa control H37Rv, **Carril 2:** Cepa Control 323, **Carril 3:** Cepa B001, **Carril 4:** Cepa B003M, **Carril 5:** Cepa B008, Peso Molecular (**PM**): 561 pb, 4 copias MIRU cada uno; **Carril 6:** Control negativo. **Carriles 7-11 VNTR 48.** **Carril 7:** Cepa control H37Rv **PM**: 507 pb, 3 copias MIRU; **Carril 8:** Cepa Control 323, **PM**: 448 pb, 2 copias MIRU; **Carril 9:** Cepa B001, **PM**: 507 pb, 3 copias MIRU; **Carril 10:** Cepa B003M, **PM**: 448 pb, 2 copias MIRU. **Carril 11:** Cepa B008, **PM**: 497 pb, 3 copias MIRU. **Carriles 12-16 VNTR 49.** **Carril 12:** Cepa control H37Rv **PM**: 482 pb, 3 copias MIRU; **Carril 13:** Cepa Control 323, **PM**: 482 pb, 3 copias MIRU; **Carril 14:** Cepa B001 **PM**: 450 pb, 2 copias MIRU; **Carril 15:** Cepa B003M, **PM**: 482 pb, 3 copias MIRU; **Carril 16:** Cepa B008, **PM**: 450 pb, 2 copias MIRU.

Figura 23. Amplificación de los loci MIRU 20, MIRU 24, MIRU 27, VNTR 42 y VNTR 43



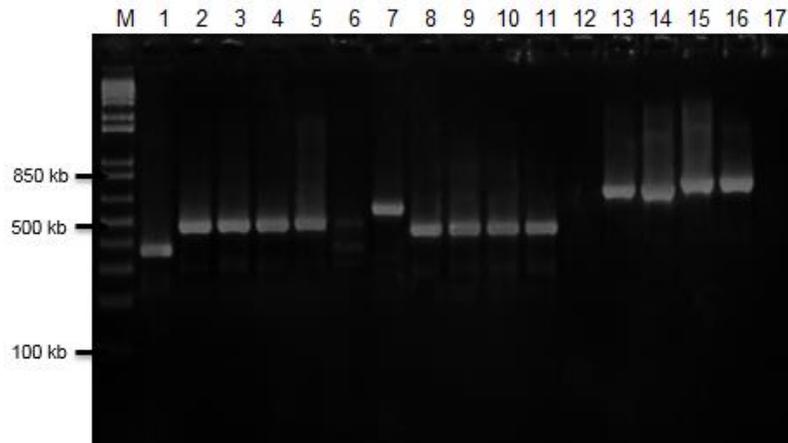
M: Marcador de peso molecular de 1 KB. **Carril 1:** Control negativo. **Carriles 2-5 MIRU 20.** **Carril 2:** Cepa control H37Rv Peso Molecular (**PM**): 594 pb, 2 copias MIRU; **Carril 3:** Cepa Control 323, **PM**: no amplificó; **Carril 4:** Cepa B001, **Carril 5:** Cepa B003M, **PM**: 594 pb, 2 copia MIRU cada uno. **Carriles 6-9 MIRU 24.** **Carril 6:** Cepa control H37Rv, **Carril 7:** Cepa Control 323, **Carril 8:** Cepa B001, **Carril 9:** Cepa B003M, **PM**: 487 pb, 1 copia MIRU cada uno. **Carriles 10-13 MIRU 27.** **Carril 10:** Cepa control H37Rv, **Carril 11:** Cepa Control 323, **Carril 12:** Cepa B001, **Carril 13:** Cepa B003M, **PM**: 645 pb, 3 copias MIRU cada uno. **Carriles 14-17 VNTR 42.** **Carril 14:** Cepa control H37Rv, **Carril 15:** Cepa Control 323, **Carril 16:** Cepa B001, **Carril 17:** Cepa B003M, **PM**: 634 pb, 2 copias MIRU cada uno. **Carril 18: VNTR 43,** Cepa control H37Rv, **PM**: 380 pb, 4 copias MIRU.

Figura 24. Amplificación de los loci VNTR 43, ETR A, QUB-11b y VNTR 1955



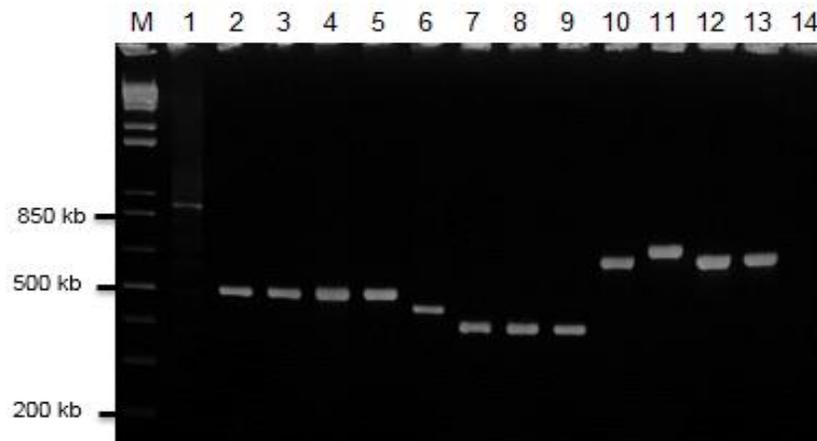
M: Marcador de peso molecular de 1 KB. **Carril 1:** Control negativo. **Carriles 2 y 3 VNTR 43.** **Carril 2:** Cepa B001, Peso Molecular (**PM**): 324 pb, 3 copias MIRU; **Carril 3:** Cepa B003M, **PM**: 324 pb, 3 copias MIRU. **Carriles 4-7 ETR A.** **Carril 4:** Cepa control H37Rv, **PM**: 418 pb, 3 copias MIRU; **Carril 5:** Cepa Control 323, **PM**: No amplificó; **Carril 6:** Cepa B001, **Carril 7:** Cepa B003M, **PM**: 418 pb, 3 copias MIRU cada uno. **Carriles 8-11 QUB-11b.** **Carril 8:** Cepa control H37Rv **PM**: 400 pb, 5 copias MIRU; **Carril 9:** Cepa Control 323, **PM**: 640 pb, 10 copias MIRU; **Carril 10:** Cepa B001, **PM**: 326 pb, 4 copias MIRU; **Carril 11:** Cepa B003M, **PM**: 400 pb, 5 copias MIRU. **Carriles 12-15 VNTR 1955.** **Carril 12:** Cepa control H37Rv **PM**: 192 pb, 2 copias MIRU; **Carril 13:** Cepa Control 323, **PM**: 328 pb, 4 copias MIRU; **Carril 14:** Cepa B001, **PM**: 221 pb, 2 copias MIRU; **Carril 15:** Cepa B003M, **PM**: 192 pb, 2 copias MIRU.

Figura 25. Amplificación de los loci VNTR 47, VNTR 52 y VNTR 53



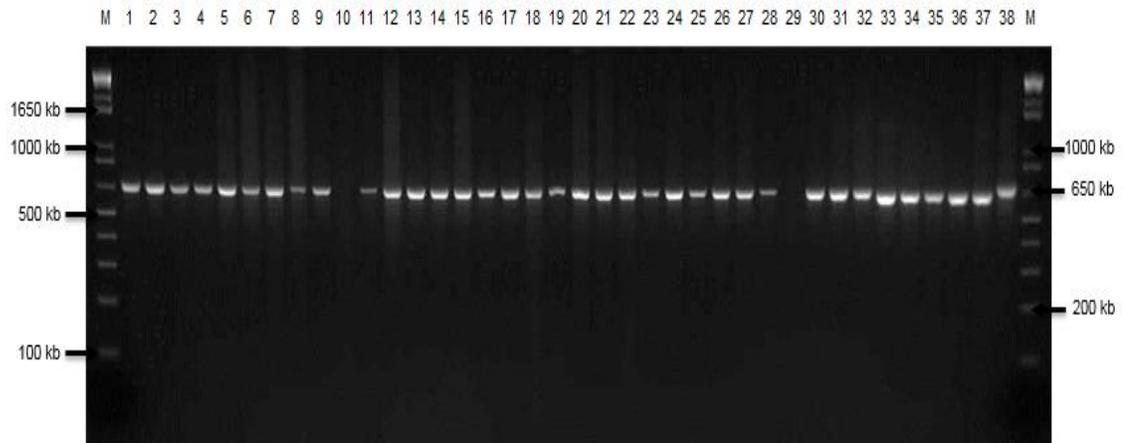
M: Marcador de peso molecular de 1 KB. **Carriles 1-6 VNTR 47.** **Carril 1:** Cepa control H37Rv, Peso Molecular (**PM**): 362 pb, 2 copias MIRU; **Carril 2:** Cepa Control 323, **Carril 3:** Cepa B001, **Carril 4:** Cepa B003M, **Carril 5:** Cepa B003M, **Carril 6:** Cepa B008. **PM:** 486 pb, 4 copias MIRU cada uno. **Carriles 7-12 VNTR 52.** **Carril 7:** Cepa control H37Rv **PM:** 565 pb, 5 copias MIRU; **Carril 8:** Cepa Control 323, **Carril 9:** Cepa B001, **Carril 10:** Cepa B003M. **Carril 11:** Cepa B008, **PM:** 465 pb, 3 copias MIRU cada uno. **Carril 12:** Cepa B008M, no amplificó. **Carriles 13-16 VNTR 53.** **Carril 13:** Cepa control H37Rv, **PM:** 680 pb, 2 copias MIRU; **Carril 14:** CepaControl 323, **PM:** 680 pb, 2 copias MIRU; **Carril 15:** Cepa B001 **PM:** 720 pb, 3 copias MIRU; **Carril 16:** Cepa B003M, **PM:** 720 pb, 3 copias MIRU. **Carril 17:** Control negativo.

Figura 26. Amplificación de los loci MIRU 2, MIRU 23 y MIRU 39



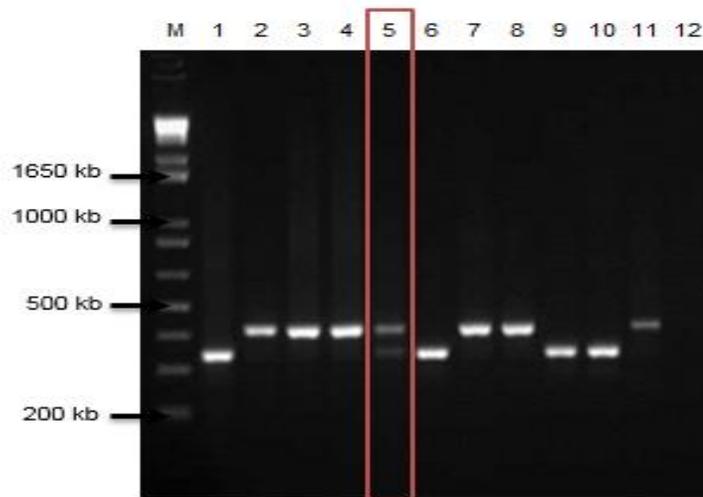
M: Marcador de peso molecular de 1 KB. **Carril 1: QUB-26,** cepa B003M, Peso Molecular (**PM**): 927 pb, 7 copias MIRU; **Carriles 2-5 MIRU 2.** **Carril 2:** Cepa control H37Rv, **Carril 3:** Cepa Control 323, **Carril 4:** Cepa B001, **Carril 5:** Cepa B003M, **PM:** 500 pb, 2 copias MIRU. **Carriles 6-9 MIRU 23.** **Carril 6:** Cepa control H37Rv, **PM:** 454 pb, 6 copias MIRU. **Carril 7:** Cepa Control 323, **Carril 8:** Cepa B001, **Carril 9:** Cepa B003M, **PM:** 389 pb, 5 copias MIRU cada uno. **Carriles 10-13 MIRU 39.** **Carril 10:** Cepa control H37Rv, **PM:** 642 pb, 2 copias MIRU; **Carril 11:** Cepa Control 323, **PM:** 650 pb, 2 copias MIRU; **Carril 12:** Cepa B001, **Carril 13:** Cepa B003M, **PM:** 642 pb, 2 copias MIRU cada uno. **Carril 14:** Control negativo.

Figura 27. Amplificación de los loci MIRU 27 y VNTR 42



M: Marcador de peso molecular de 1 KB. **Carriles 1-32 MIRU 27.** **Carril 1:** Cepa control H37Rv, Peso Molecular (**PM**): 644 pb, 3 copias MIRU. **Carril 2 – carril 32:** Cepas evaluadas, **PM**: 644 pb, 3 copias MIRU. **Carril 10 y carril 29:** no amplificaron. **Carriles 33-38 VNTR 42.** **Carril 33:** Cepa control H37Rv, **PM**: 634 pb, 2 copias MIRU; **Carril 34 – carril 38:** Cepas evaluadas, **PM**: 634 pb, 2 copias MIRU.

Figura 28. Infección policlonal detectada.

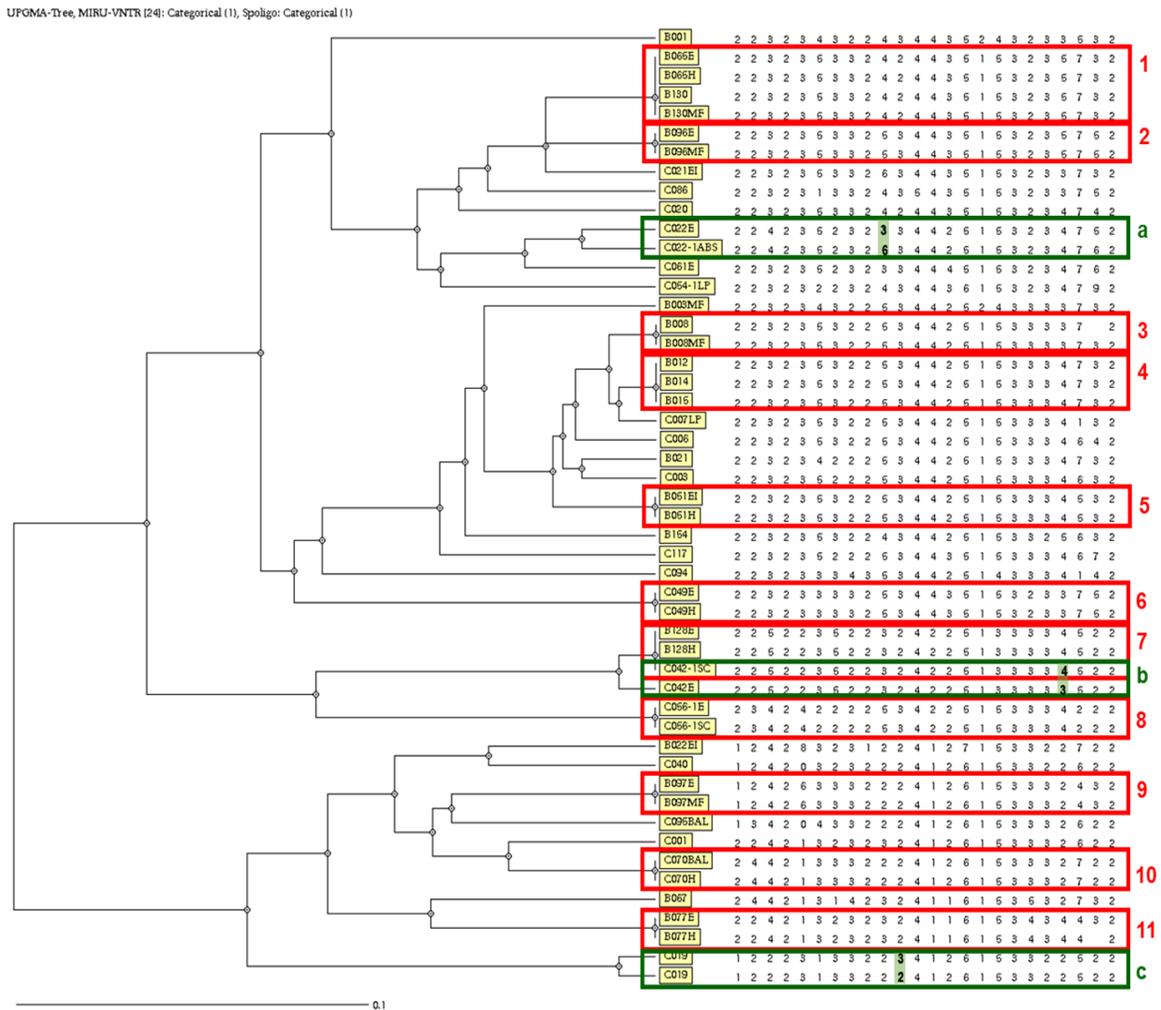


M: Marcador de peso molecular de 1 KB. **Carriles 1-15 ETR A.** **Carril 1:** Cepa C001, Peso Molecular (**PM**): 335 pb, 3 copias MIRU. **Carril 2 – carril 4:** Cepas evaluadas, **PM**: 424 pb, 3 copias MIRU. **Carril 5:** cepa C019, se presentó una infección policlonal. **PM**: 424 pb, 3 copias MIRU y **PM**: 335 pb, 2 copias MIRU. **Carril 6:** cepa C020, **Carril 6:** cepa C020, **Carril 9:** cepa C040, **Carril 10:** cepa C042, **PM**: 335 pb, 2 copias MIRU. **Carril 7:** cepa C021, **Carril 8:** cepa C022, **Carril 11:** cepa C049, **PM**: 424 pb, 3 copias MIRU. **Carril 12:** Control Negativo.

6.4.2 Determinación de patrones únicos y agrupados *Mycobacterium tuberculosis* por MIRU-VNTR

Se estudiaron 49 aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*, y se obtuvieron 24/49 (48,9%) patrones únicos correspondientes a 23 pacientes (uno de ellos presentó infección policlonal, por lo tanto, se obtuvieron 2 patrones de un mismo paciente) y 26/49 (53,1%) aislados se agruparon en 11 clusters, conformados por 2 – 4 aislados. Los clusters 1, 3, 5, 6, 8, 9, 10 y 11, agruparon cada uno dos aislados, pertenecientes cada uno al mismo paciente (figura 29). El cluster 2 estuvo conformado por 3 aislados, de pacientes diferentes, captados en medicina interna, urgencias y consulta externa, en la misma semana en el HSB. El cluster 4 estaba conformado por 4 aislados obtenidos en 2 pacientes del HSB, uno ingreso al estudio en enero de 2015 y el otro en mayo de 2015.

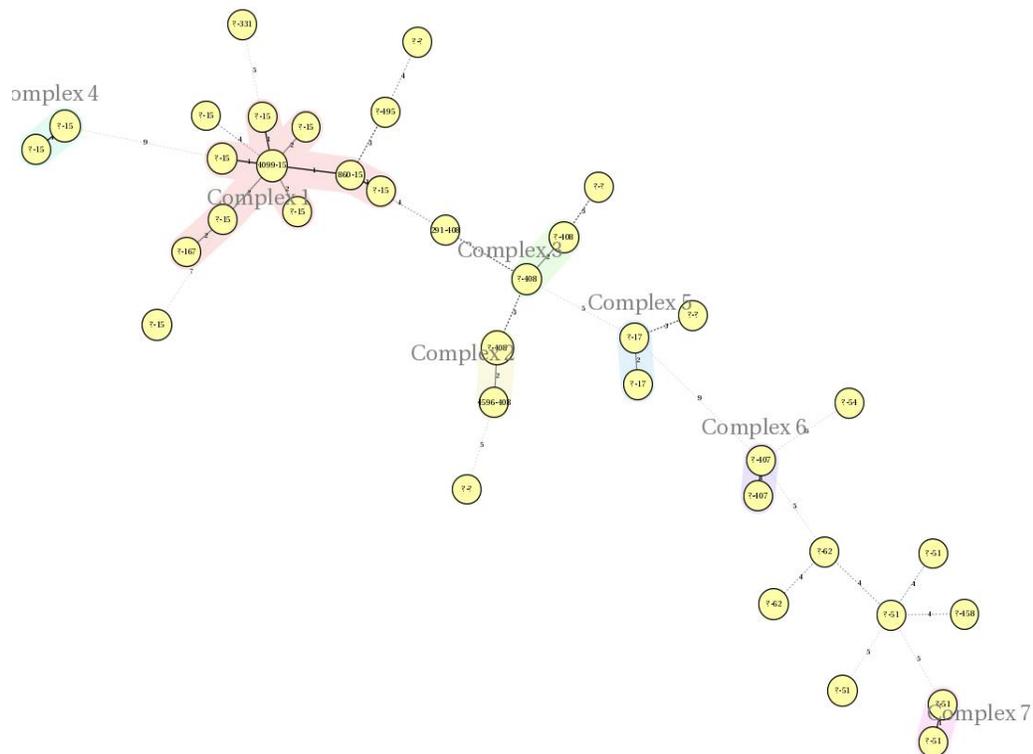
Figura 29. Identificación de los patrones MIT obtenidos por MIRU-VNTR



Adicionalmente se evidenciaron infecciones policlonales en 3 pacientes, en 2 de ellos se detectaron en dos muestras de diferente localización anatómica, mientras que en el tercero se evidenció en una sola muestra de esputo (figura 29).

Un MST se construyó basados en los patrones de MIRU-VNTR, de este análisis se obtuvieron 7 grupos principales. En la figura 30 se observan los grupos o complejos. El primero estuvo comprendido por 9 cepas, mientras que los otros complejos se agruparon con dos cepas cada uno. Al realizar análisis en conjunto con spoligotyping se observó que las cepas que conformaban el complejo más grande, correspondían al sublinaje Haarlem.

Figura 30. Árbol de mínima expansión (MST) basado en los patrones de MIRU-VNTR



En esta figura se determina la distancia filogenética entre las cepas estudiadas, y se agrupan de acuerdo a su similitud entre ellas, en la cual se evidenciaron 7 grupos conformados de 2 a 9 cepas.

6.4.3 Determinación de frecuencia alélica de los MIRU-VNTR

Con los resultados obtenidos de los MIRU-VNTR se calcularon las frecuencias alélicas. En la tabla 11 se muestran los alelos más frecuentes de cada locus, el número de copias tuvo una variabilidad de 0 a 9 repeticiones. Los loci con mayor variación alélica fueron Miru 40 y QUB-4156 (VNTR 53) con 7 alelos diferentes, seguido por QUB-26 con 6, Miru 10 y QUB-11b con 5 cada uno. En tercer lugar, los loci Miru 16, ETRB, ETRC, Mtub34 y Mtub 39 tuvieron 4 alelos cada uno. Los loci Miru 4, Miru 27 y Miru 39 fueron los menos polimórficos ya que presentaron un único alelo.

Tabla 11. Frecuencia alélica de los MIRU-VNTR analizados

MIRU-VNTR	N° de copias										N° total de alelos
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MIRU 02		14%	86%								2
MIRU 04			100%								1
MIRU 10		6%	6%	34%	8%	46%					5
MIRU 16		2%	28%		62%	8%					4
MIRU 20		2%	96%	2%							3
MIRU 23						72%	26%	2%			3
MIRU 24		96%	4%								2
MIRU 26				8%	6%	86%					3
MIRU 27				100%							1
MIRU 31			10%	90%							2
MIRU 39			100%								1
MIRU 40	4%	12%	8%	66%	4%		4%		2%		7
VNTR ETRA		42%	58%								2
VNTR 48 (ETRB)		6%	64%	28%	2%						4
VNTR 43 (ETRC)			4%	58%	30%	8%					4
QUB-11b			18%	20%	18%	40%	4%				5
QUB-26		4%	4%		8%	18%	14%	52%			6
QUB-4156 (VNTR 53)			29%	44%	6%	13%	4%	2%		2%	7
Mtub04 (VNTR 42)			88%	6%	6%						3
Mtub 21 (1955)			42%	54%	4%						3
Mtub 29 (VNTR 46)					98%	2%					2
Mtub 30 (VNTR 47)		26%	12%		62%						3
Mtub 34 (VNTR 49)			32%	62%	4%	2%					4
Mtub 39 (VNTR 52)			22%	18%	46%	14%					4

6.4.4 Comparación entre los poderes discriminatorios de las metodologías de tipificación utilizadas en el estudio

Para calcular el poder discriminatorio de cada uno de los métodos de genotipificación se calculó por medio del índice discriminatorio de Hunter y Ganston (HGDI) (121).

La fórmula utilizada fue la siguiente: (Anexo 6)

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

Donde:

N: Número total de aislados estudiados

S: Número de clusters obtenidos

n_j: número de aislados por cluster

Dentro de las dos metodologías analizadas, el poder discriminatorio mayor fue 0,984 correspondiente a MIRU-VNTR. (Tabla 12).

Tabla 12. Comparación del poder discriminatorio entre Spoligotyping y MIRU-VNTR

Técnica	N° Cepas Agrupadas	N° Clusters	N° Patrones Únicos	HGDI
Spoligotyping	43	9	6	0,888
MIRU-VNTR 24L	26	11	24	0,984

Comparando cada locus se encontró que los locus QUB11b, VNTR-53, VNTR-52, MIRU10 y QUB265 fueron los más discriminatorios (HGDI >0,6), siendo el locus QUB11b el de mayor poder (0,754). (Tabla 13)

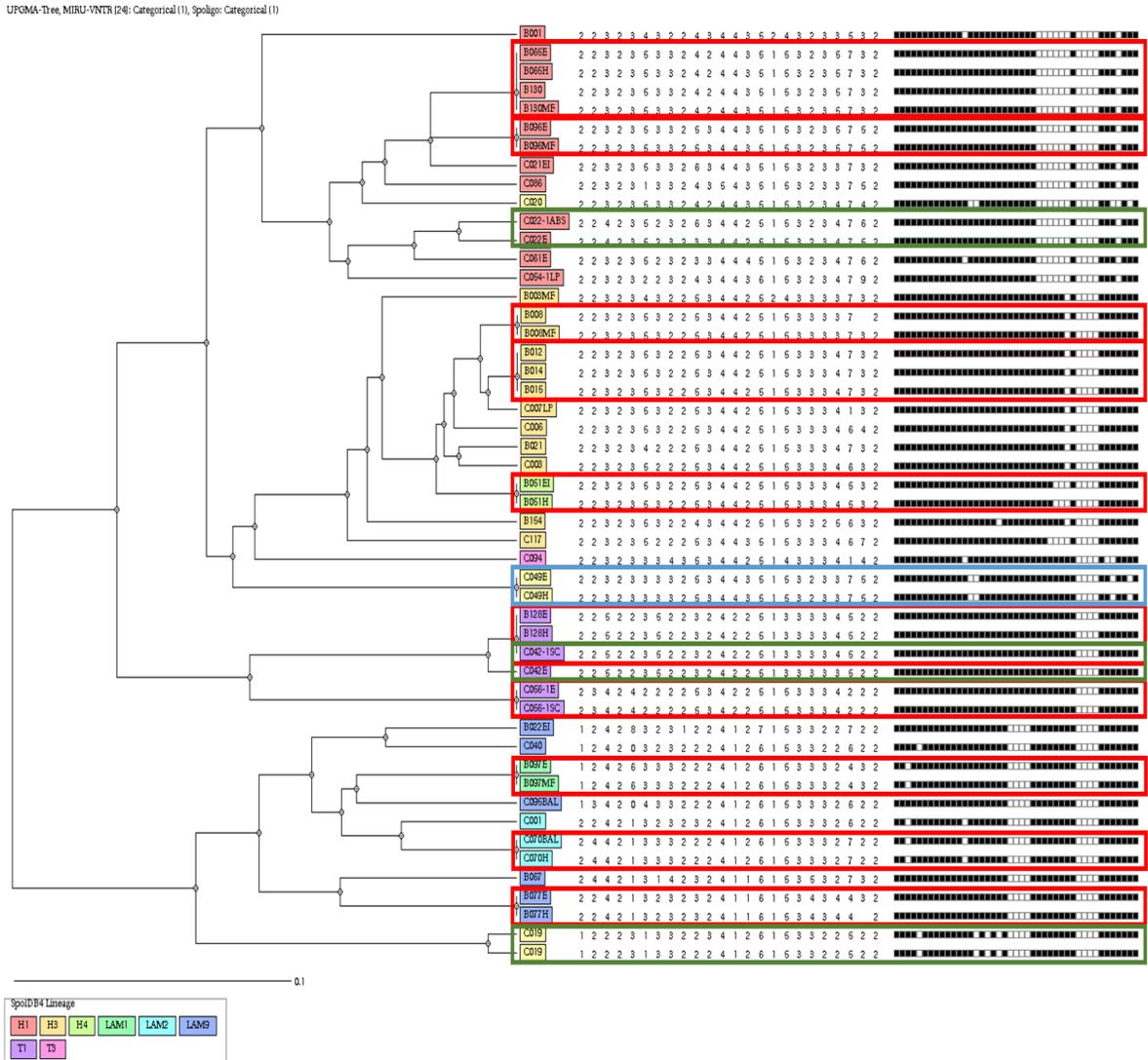
Tabla 13. Diversidad alélica usando HGDI para MIRU-VNTR 24 loci en 49 aislados de *M. tuberculosis* de pacientes VIH positivos

MIRU-VNTR	HGDI
MIRU 02	0,261
MIRU 04	0,020
MIRU 10	0,679
MIRU 16	0,550
MIRU 20	0,097
MIRU 23	0,433
MIRU 24	0,096
MIRU 26	0,270
MIRU 27	0,020
MIRU 31	0,200
MIRU 39	0,020
MIRU 40	0,558
VNTR ETRA	0,507
VNTR 48 (ETRB)	0,528
VNTR 43 (ETRC)	0,585
QUB-11b	0,754
QUB-26	0,688
QUB-4156 (VNTR 53)	0,722
Mtub04 (VNTR 42)	0,238
Mtub 21 (1955)	0,550
Mtub 29 (VNTR 46)	0,059
Mtub 30 (VNTR 47)	0,553
Mtub 34 (VNTR 49)	0,531
Mtub 39 (VNTR 52)	0,708

6.5 Genotipificación de los aislados de *Mycobacterium tuberculosis* por spoligotyping y MIRU-VNTR

Por Spoligotyping, el cluster conformado por 11 aislados (SIT62), se subdividió por MIRU-VNTR en dos clusters que agruparon 2 y 4 aislados respectivamente y 5 aislados se identificaron como patrones únicos. El cluster SIT53 conformado por 10 aislados, fue subdividido en dos clusters que agruparon 2 y 3 aislados respectivamente y 5 aislados correspondieron a patrones únicos. (Figura 31)

Figura 31. Identificación de los patrones obtenidos por Spoligotyping y MIRU-VNTR



Los números marcados en color rojo, el número 6 en azul es un cluster con un patrón huérfano y está formado por 2 aislados de un mismo paciente, Las letras en color verde, representan un paciente cada una con diferente patrón obtenido, indicando infecciones policlonales; a y b, corresponden a 2 muestras de un mismo paciente, mientras que c, es una sola muestra de esputo obtenida de un paciente.

El MST basado en las dos metodologías empleadas mostró al igual que el análisis realizado con MIRU-VNTR, 7 grupos principales. Sin embargo, se pudo diferenciar con mayor claridad la reorganización de los SITs/familias obtenidas previamente mediante spoligotyping. Se observó una mayor distancia entre los sublinajes LAM y Haarlem. Las familias pertenecientes al sublinaje Haarlem, tuvieron una mayor distribución y una mayor distancia entre sí. (Figura 32)

6.6 Análisis de asociación estadística entre las cepas agrupadas y la población en estudio.

Este análisis de comparación de variables se realizó utilizando el método exacto de Fisher. Se tomó un nivel de significación de 0,05 y un intervalo de confianza del 95%. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los agrupados y las variables analizadas. En la tabla 14 se muestran los resultados obtenidos con cada variable.

Tabla 14. Asociación entre agrupamientos con variables demográficas y clínicas.

	Variables	No Agrupados	Agrupados	p
Sexo	Masculino	19	9	0,217
	Femenino	3	5	
SGSSS	Régimen subsidiado	16	10	1,000
	Vinculado - SISBEN	6	4	
Servicio	Hospitalizado	21	13	1,000
	Consulta externa	1	1	
Raza	Blanco	2	1	0,725
	Indígena	0	1	
	Mestizo	20	12	
Lugar de residencia	Habitante de calle	7	3	0,819
	Privado de la libertad	1	0	
	Casa	14	11	
Índice de Masa Corporal (IMC)	> 18,5 kg/m ²	12	4	0,176
	< 18,5 kg/m ²	10	10	
CD4+*	<50 cel/μl	7	5	0,620
	50-250 cel/μl	8	4	
	>250 cel/μl	3	0	
Psicoactivos	No	10	12	0,732
	Si	5	9	
Fuma	No	17	5	0,073
	Si	6	8	
Alcohol	No	10	12	0,485
	Si	4	10	
Terapia antiretroviral**	No	15	7	0,432
	Si	12	2	
Coinfecciones	No	9	13	0,501
	Si	4	10	
BCG	No	4	18	1,000
	Si	2	12	
Antecedentes TB	No	14	8	0,727
	Si	10	12	
Sarcoma de Kaposi	No	21	1	0,547
	Si	12	2	

7. DISCUSIÓN

La epidemia del VIH se expande en proporciones significativas y especialmente en sindemia con TB. Según la OMS, actualmente en el mundo un tercio de los 38,6 millones de personas infectadas por el VIH también están infectadas por TB, con un riesgo elevado de padecer TB activa y fallecer por esta causa (123). Por esa razón es de gran importancia realizar estudios que permitan generar estrategias con el fin de disminuir la morbimortalidad y los costos que representa en esta población y que promuevan la integración de los programas VIH y TB, ya que tienden a funcionar por separado (124).

La tuberculosis es la infección oportunista más común en personas infectadas por el VIH y es la causa principal de muerte, en países de ingresos bajos y medianos, en estos pacientes, antes y durante el tratamiento antirretroviral (125). El VIH es el factor de riesgo más significativo para la TB, incrementando el riesgo comparado con personas no infectadas con el VIH (126).

El presente estudio mostró una mayor proporción de hombres, menores de 45 años, lo cual coincide con lo reportado previamente tanto para TB como para VIH (1, 5, 64, 66, 127, 128). El 44% de la población de estudio presentaba un estado de desnutrición y el 63% refirió haber padecido infecciones oportunistas asociadas a la infección por VIH, tales como diarrea crónica, candidiasis y pneumocistosis, diferente al estudio realizado por Peñuela M. y col., en el año 2006, donde la desnutrición se presentó solamente en el 32% de los pacientes y las enfermedades oportunistas en el 28% (127). Sin embargo, en un estudio realizado en Etiopía en el 2011, se obtuvo una desnutrición del 54% en los pacientes estudiados, compatible con lo presentado en este estudio (129).

Factores como consumo de alcohol y sustancias psicoactivas se han asociado con la TB en pacientes VIH positivos (127, 129), estas condiciones están presentes en más del 50% de los pacientes estudiados. Igualmente, el recuento de linfocitos T CD4+ menor a 250 cel/ μ l está estrechamente relacionado con la TB y sus complicaciones (129-133), aumentando de manera importante el riesgo de mortalidad temprana.

Adicionalmente 27/36 (75%) de los pacientes no estaban consumiendo TARGA, aumentando las probabilidades para no solo adquirir TB sino cualquier infección oportunista y por consiguiente el deterioro físico e inmunológico (127, 134). Aunque en la actualidad se dispone de los medicamentos antirretrovirales, se presentó una muy baja adherencia al tratamiento, atribuido principalmente a los problemas

administrativos presentados en las entidades de salud (132) y condiciones de drogadicción. Estos hallazgos pueden ser probablemente debidos a que los hospitales donde se llevó a cabo la captación de pacientes son de carácter público.

El presente estudio mostró la presencia de TB extrapulmonar en el 42% de los pacientes con TB, con predominio de TB diseminada en el 60%, similar a lo encontrado en otros estudios (135-137).

El estudio de farmacoresistencia en TB es de gran importancia en salud pública, principalmente en coinfección con el VIH, el uso de métodos moleculares acelera la caracterización y detección de TB-MDR constituyendo una herramienta valiosa en el tratamiento de la TB resistente. Este estudio evaluó el método molecular Genotype MTBDR*plus* 2.0 frente al método BACTEC™ MGIT™ SIRE en 49 (100%) aislados y encontró una concordancia del 96%, resultado similar al encontrado en estudios previos (138-140) y una discordancia de 4% entre dos muestras correspondientes a un mismo paciente, posiblemente esta diferencia se deba a la existencia de infección policlonal evidenciada en la genotipificación por la técnica MIRU-VNTR. Estos resultados son similares a los encontrados en dos estudios previos (122, 141).

Se ha observado que el linaje 4 o Euro-Americano está presente en todo el mundo con predominio en Europa y América Latina (14, 87, 142) y junto con el Linaje 2, son los más virulentos (22). Dentro de este linaje, los sublinajes Haarlem y LAM también están muy dispersos alrededor del mundo y las migraciones humanas podrían explicarlo. Probablemente estos dos linajes llegaron a América durante la colonización europea en los siglos XVIII y XIX (15). En estudios realizados en Brasil (143, 144), Venezuela (145), Paraguay (146) y Chile (89), el sublinaje más prevalente ha sido LAM. Sin embargo, pueden variar dentro de un mismo país, como se describió en el estudio realizado por Realpe T., y col., que encontró predominio de Haarlem (48,7%) en la ciudad de Medellín; en Cali LAM y Haarlem tuvieron la misma prevalencia (39%) y en Cauca, el más prevalente fue T (40%) (13); en Bogotá Cerezo Ml., y col., encontraron un predominio de LAM (49,3%). En Argentina se presentó diferencia entre sublinajes con respecto a la presencia de cepas MDR y XDR, Haarlem fue responsable de un brote en pacientes VIH ocurrido en un hospital de la capital (147), mientras que LAM fue más prevalente en un estudio que incluyó cepas de diferentes ciudades del país (38,8%) (148). Igualmente, en otro estudio realizado por Ritaco V. y col., en el 2012, donde genotipificaron cepas obtenidas de Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Venezuela y España, el sublinaje LAM fue el que más prevaleció (37,2%) (72). En Perú, uno de los países de mayor tasa de

incidencia de TB MDR en América Latina (149), tiene una gran variabilidad en cuanto a la prevalencia de los sublinajes. Otros estudios realizados en Perú encontraron mayor prevalencia de LAM (149, 150); mientras que otro estudio realizado también en el mismo país mostró una prevalencia similar de LAM, Haarlem y T (151) y recientemente, Barletta F. y col., reportaron en Lima una mayor prevalencia de Haarlem (152).

En pacientes VIH positivos, existe un gran desconocimiento sobre los genotipos circulantes de *M. tuberculosis*. En Perú, Sheen P. y col., observaron que el sublinaje que predominó en estos pacientes fue LAM con una prevalencia del 26% (150), mientras que en Argentina prevaleció el sublinaje Haarlem con un 60% en esta misma población (148). En Colombia, los estudios de genotipificación realizados se han dirigido a la población general y han tenido un bajo porcentaje de pacientes VIH positivos (13, 26-28). El spoligotyping realizado en el presente trabajo, identificó 49 aislados como *M. tuberculosis* y el sublinaje que predominó fue Haarlem con el 55% a diferencia por lo reportado por Cerezo MI. y col. (26), pero similar a lo reportado por Realpe T. y col., donde hubo mayor prevalencia de Haarlem en individuos infectados con VIH, sin embargo, solamente 13 pacientes tenían serología positiva confirmada en ese estudio (13).

Los sublinajes circulantes encontrados en los pacientes coinfectados en este estudio, fueron diferentes entre los hospitales, así en el HSB el 70% correspondió a Haarlem y no hubo patrones huérfanos, mientras que, en el HSC, Haarlem tuvo una prevalencia del 47,4%, mientras que los sublinajes LAM, T y los patrones huérfanos correspondieron al 52,6%, quizás debido al tipo de población que se atiende en cada hospital, ya que al hospital Santa Clara acuden más habitantes en situación de calle y personas que no tienen un hogar estable, que residen en albergues y lugares de gran hacinamiento, tal vez, por su localización en la ciudad, más cerca de las zonas de tolerancia. Adicionalmente, en la población en situación de calle, se obtuvieron todos los sublinajes presentes en el estudio, probablemente debido a su movilización continua, la no adherencia al TARGA y condiciones de riesgo que aumentan la dispersión de los genotipos circulantes entre ellos.

Por medio de la metodología MIRU-VNTR fue posible detectar infección policlonal en 3 pacientes, en 2 de ellos en dos muestras de diferente localización anatómica, mientras que en el tercero se evidenció en una sola muestra de esputo; uno de ellos presentó una un patrón de resistencia diferente. Estos hallazgos resaltan la importancia de esta técnica para la detección de infecciones mixtas causadas por diferentes genotipos, unos sensibles y otros resistentes y brindan además una

alternativa para tomar decisiones en cuanto al tratamiento, este hallazgo ha sido previamente reportado en Georgia, India y Sur África (122, 141, 153).

En cuanto al poder de discriminación, spoligotyping como se ha visto en trabajos previos, fue menor que el de MIRU-VNTR (13, 26, 89, 96) y con una menor tasa de agrupamiento. Esto es debido a que el polimorfismo que ofrece esta técnica, se basa en la amplificación de un solo locus, por lo tanto, se pueden encontrar espoligotipos semejantes en cepas sin relación epidemiológica alguna (154). Es por ello que esta técnica se debe utilizar en conjunto con otras técnicas moleculares de genotipificación (155). Por su parte, el MIRU-VNTR, tuvo el mismo HGDI analizado como única técnica y en conjunto con el spoligotyping, similar a lo que se ha reportado previamente (13, 26, 156-158). Con respecto a cada locus evaluado los que tuvieron un mayor poder discriminatorio fueron QUB-11b (0,754), VNTR 53 (0,722) y QUB-26 (0,688), contribuyendo a una mayor diferenciación de las cepas estudiadas, hallazgo similar al encontrado en otro estudio colombiano (13).

De las variables epidemiológicas evaluadas, en el presente estudio no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los aislados agrupados y las variables analizadas, como lo reportaron previamente Cerezo MI. y col. (26). En otro estudio realizado por Lari y col., en Italia, solamente encontraron asociación con la edad de los pacientes (159), esto podría indicar que los pacientes coinfectados presentan heterogeneidad en la presentación clínica, por lo que son difíciles de diagnosticar.

El presente estudio de genotipificación de *M. tuberculosis* en pacientes VIH positivos, representa una línea de base para el control de la TB en la población de personas que conviven con el VIH. Se requieren hacer más estudios a nivel nacional para evaluar la dinámica de transmisión de la TB en esta importante población vulnerable, que permita el control de brotes relacionados no solo en hospitales sino en lugares con alto riesgo como son prisiones, colegios y albergues.

Como una estrategia a futuro, podría emplearse la secuenciación del genoma completo para resolver casos de brotes e infecciones policlonales que puedan presentarse.

8. CONCLUSIONES

- * Las características demográficas y clínicas tales como sexo, edad, recuento de linfocitos T CD4+, infecciones oportunistas y desnutrición encontradas en los pacientes coinfectados concuerdan con lo encontrado en otros estudios.
- * La mayoría de aislados estudiados (94%) fueron sensibles a los medicamentos antituberculosos, no se encontraron aislados MDR.
- * De acuerdo a lo esperado, la mayoría de cepas pertenecieron al Linaje Euro americano (92%), con predominio del sub-linaje Haarlem (55%) y se presentó un 8% de patrones huérfanos que podrían ser autóctonos.
- * El método MIRU-VNTR permitió la detección de infecciones mixtas y tuvo un poder discriminatorio mayor que Spoligotyping.
- * El análisis de diferentes muestras clínicas en los pacientes, aumentan la probabilidad de detectar infecciones mixtas de TB, identificados utilizando el método MIRU-VNTR 24 loci.

DIFUSIÓN Y DIVULGACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron presentados en:

1. Congreso Internacional: 36th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, June 28th to July 1st, 2015, en Riga (Latvia). Anexo 7

Modalidad Poster:

“Mycobacterial infections in HIV-infected individuals in Bogotá”.

2. Congreso internacional: 37th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, July 3-July 6, 2016 Catania-Sicily (Italia). Anexo 8

Modalidad Poster:

“The Prevalence of Mycobacterial infections in HIV-infected patients from Bogota, Colombia”.

BIBLIOGRAFIA

1. WHO. Global tuberculosis report 2015. Switzerland: World Health Organization, 2015.
2. WHO. WHO publishes Global tuberculosis report 2013 2013.
3. INS. Boletín Epidemiológico Semanal. Colombia: Instituto Nacional de Salud, 2015 Diciembre 2015. Report No.
4. SDS. Boletín Epidemiológico Distrital a Semana 52. Bogotá: Secretaría Distrital de Salud, 2015 Diciembre 2015. Report No.
5. WHO. HIV/AIDS: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/>; 2015. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/>.
6. Social MdSyP. Análisis de situación de Salud. Colombia, 2014. Imprenta Nacional de Colombia © Ministerio de Salud y Protección Social. 2014:238.
7. Castiblanco César Augusto, Llerena PC. Tuberculosis en Colombia: análisis de la situación epidemiológica, año 2006. Asociación Colombiana de Infectología. 2008;12(3):159-73.
8. Castiblanco César Augusto, Willman R. Coinfección de tuberculosis en pacientes con VIH/SIDA: un análisis según las fuentes de información en Colombia. Asociación Colombiana de Infectología. 2006;10(4):232-42.
9. Gutierrez Rodríguez R, Gotuzzo Herencia E. Co- infección VIH y Tuberculosis. Uso de antirretrovirales Instituto de Medicina Tropical "AvH" Facultad de Medicina Universidad Peruana Cayetano Heredia Telemedicina.1-20.
10. Ticona Mendoza A, Iglesias Quilca D. Tuberculosis en pacientes con VIH/SIDA. Acta Médica Peruana. 2008;25(4):247-54.
11. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. Journal of clinical microbiology. 2006;44(12):4498-510.
12. Wilson WR. walter. Diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas. Manual Moderno. 2004.
13. Realpe T, Correa N, Roza JC, Ferro BE, Gomez V, Zapata E, et al. Population structure among mycobacterium tuberculosis isolates from pulmonary tuberculosis patients in Colombia. PLoS one. 2014;9(4):e93848.
14. Coscolla M, Gagneux S. Does M. tuberculosis genomic diversity explain disease diversity? Drug discovery today Disease mechanisms. 2010;7(1):e43-e59.
15. Brites D, Gagneux S. Co-evolution of Mycobacterium tuberculosis and Homo sapiens. Immunological reviews. 2015;264(1):6-24.
16. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, et al. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002;99(6):3684-9.
17. Click ES, Moonan PK, Winston CA, Cowan LS, Oeltmann JE. Relationship between Mycobacterium tuberculosis phylogenetic lineage and clinical site of tuberculosis. Clin Infect Dis. 2012;54(2):211-9.
18. Lari N, Rindi L, Cristofani R, Rastogi N, Tortoli E, Garzelli C. Association of Mycobacterium tuberculosis complex isolates of BOVIS and Central Asian (CAS) genotypic lineages with extrapulmonary disease. Clin Microbiol Infect. 2009;15(6):538-43.
19. Caws M, Thwaites G, Dunstan S, Hawn TR, Lan NT, Thuong NT, et al. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with Mycobacterium tuberculosis. PLoS pathogens. 2008;4(3):e1000034.
20. Berg S, Schelling E, Hailu E, Firdessa R, Gumi B, Erenso G, et al. Investigation of the high rates of extrapulmonary tuberculosis in Ethiopia reveals no single driving factor and minimal evidence for zoonotic transmission of Mycobacterium bovis infection. BMC infectious diseases. 2015;15:112.
21. Firdessa R, Berg S, Hailu E, Schelling E, Gumi B, Erenso G, et al. Mycobacterial lineages causing pulmonary and extrapulmonary tuberculosis, Ethiopia. Emerging infectious diseases. 2013;19(3):460-3.
22. Coscolla M, Gagneux S. Consequences of genomic diversity in Mycobacterium tuberculosis. Seminars in immunology. 2014;26(6):431-44.
23. Borrell S, Gagneux S. Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 2009;13(12):1456-66.
24. Lopez B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C, Ritacco V, et al. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different Mycobacterium tuberculosis genotypes. Clinical and experimental immunology. 2003;133(1):30-7.

25. Abebe F, Bjune G. The emergence of Beijing family genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* and low-level protection by bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccines: is there a link? *Clinical and experimental immunology*. 2006;145(3):389-97.
26. Cerezo I, Jimenez Y, Hernandez J, Zozio T, Murcia MI, Rastogi N. A first insight on the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex as studied by spoligotyping and MIRU-VNTRs in Bogota, Colombia. *Infect Genet Evol*. 2012;12(4):657-63.
27. Murcia MI, Manotas M, Jimenez YJ, Hernandez J, Cortes MI, Lopez LE, et al. First case of multidrug-resistant tuberculosis caused by a rare "Beijing-like" genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in Bogota, Colombia. *Infect Genet Evol*. 2010;10(5):678-81.
28. Nieto LM, Ferro BE, Villegas SL, Mehaffy C, Forero L, Moreira C, et al. Characterization of extensively drug-resistant tuberculosis cases from Valle del Cauca, Colombia. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(12):4185-7.
29. de Paz David A, Laura P, Edgardo Q, Fernanda ML, Magda C, Nora G, et al. Resistencia a fármacos antituberculosis en pacientes coinfectados con tuberculosis y virus de la inmunodeficiencia humana, en un hospital de referencia de 2007 a 2010 en Cali (Colombia). *Infectio*. 2012;16(3):161-5.
30. Bruchfeld J, Correia-Neves M, Kallenius G. Tuberculosis and HIV Coinfection. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2015;5(7):a017871.
31. OPS. La tuberculosis en la Región de las Américas. Informe Regional 2012. Epidemiología, control y financiamiento. Organización Panamericana de la Salud. 2013:1-52.
32. FondoMundial.org. Región de Las Américas. Resumen 2014. Available from: <http://lacfondomundial.org/wp-content/uploads/2015/09/Regi%C3%B3n-de-Las-Am%C3%A9ricas-resumen.pdf>.
33. OPS. La tuberculosis en Las Américas. Informe Regional 2013. Epidemiología, control y financiamiento. Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud Organización Mundial de la Salud, oficina Regional para las Américas, 2014 2014. Report No.
34. Banuls AL, Sanou A, Anh NT, Godreuil S. *Mycobacterium tuberculosis*: ecology and evolution of a human bacterium. *Journal of medical microbiology*. 2015;64(11):1261-9.
35. Lienhardt C, Glaziou P, Uplekar M, Lonnroth K, Getahun H, Raviglione M. Global tuberculosis control: lessons learnt and future prospects. *Nature reviews*. 2012;10(6):407-16.
36. Kaufmann SHE, Walker BD. AIDS and Tuberculosis. Federal Republic of Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA,; 2009. 322 p.
37. Cook GM, Berney M, Gebhard S, Heinemann M, Cox RA, Danilchanka O, et al. Physiology of mycobacteria. *Advances in microbial physiology*. 2009;55:81-182, 318-9.
38. Guenin-Mace L, Simeone R, Demangel C. Lipids of pathogenic *Mycobacteria*: contributions to virulence and host immune suppression. *Transboundary and emerging diseases*. 2009;56(6-7):255-68.
39. de Jong BC, Antonio M, Gagneux S. *Mycobacterium africanum*--review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4(9):e744.
40. Fabre M, Hauck Y, Soler C, Koeck JL, van Ingen J, van Soolingen D, et al. Molecular characteristics of "*Mycobacterium canettii*" the smooth *Mycobacterium tuberculosis* bacilli. *Infect Genet Evol*. 2010;10(8):1165-73.
41. Smith NH, Crawshaw T, Parry J, Birtles RJ. *Mycobacterium microti*: More diverse than previously thought. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(8):2551-9.
42. Xavier Emmanuel F, Seagar AL, Doig C, Rayner A, Claxton P, Laurenson I. Human and animal infections with *Mycobacterium microti*, Scotland. *Emerging infectious diseases*. 2007;13(12):1924-7.
43. Aranaz A, Liebana E, Gomez-Mampaso E, Galan JC, Cousins D, Ortega A, et al. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *International journal of systematic bacteriology*. 1999;49 Pt 3:1263-73.
44. Chiari M, Zanoni M, Alborali LG, Zanardi G, Avisani D, Tagliabue S, et al. Isolation of *Mycobacterium caprae* (Lechtal genotype) from red deer (*Cervus elaphus*) in Italy. *Journal of wildlife diseases*. 2014;50(2):330-3.
45. Jenkins HE, Cox DR, Delahay RJ. Direction of association between bite wounds and *Mycobacterium bovis* infection in badgers: implications for transmission. *PloS one*. 2012;7(9):e45584.
46. van Ingen J, Rahim Z, Mulder A, Boeree MJ, Simeone R, Brosch R, et al. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerging infectious diseases*. 2012;18(4):653-5.
47. van Ingen J, Brosch R, van Soolingen D. Characterization of *Mycobacterium orygis*. *Emerging infectious diseases*. 2013;19(3):521-2.
48. Parsons SD, Drewe JA, Gey van Pittius NC, Warren RM, van Helden PD. Novel cause of tuberculosis in meerkats, South Africa. *Emerging infectious diseases*. 2013;19(12):2004-7.
49. Coscolla M, Lewin A, Metzger S, Maetz-Rennsing K, Calvignac-Spencer S, Nitsche A, et al. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex isolate from a wild chimpanzee. *Emerging infectious diseases*. 2013;19(6):969-76.

50. Mostowy S, Cousins D, Behr MA. Genomic interrogation of the dassie bacillus reveals it as a unique RD1 mutant within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of bacteriology*. 2004;186(1):104-9.
51. Pawlowski A, Jansson M, Skold M, Rottenberg ME, Kallenius G. Tuberculosis and HIV co-infection. *PLoS pathogens*. 2012;8(2):e1002464.
52. Girardi E, Sabin CA, d'Arminio Monforte A, Hogg B, Phillips AN, Gill MJ, et al. Incidence of Tuberculosis among HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy in Europe and North America. *Clin Infect Dis*. 2005;41(12):1772-82.
53. Zumla A, Raviglione M, Hafner R, von Reyn CF. Tuberculosis. *The New England journal of medicine*. 2013;368(8):745-55.
54. Getahun H, Gunneberg C, Granich R, Nunn P. HIV infection-associated tuberculosis: the epidemiology and the response. *Clin Infect Dis*. 2010;50 Suppl 3:S201-7.
55. Kwan CK, Ernst JD. HIV and tuberculosis: a deadly human syndemic. *Clinical microbiology reviews*. 2011;24(2):351-76.
56. Barnes PF, Bloch AB, Davidson PT, Snider DE, Jr. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *The New England journal of medicine*. 1991;324(23):1644-50.
57. Chaisson RE, Schechter GF, Theuer CP, Rutherford GW, Echenberg DF, Hopewell PC. Tuberculosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Clinical features, response to therapy, and survival. *The American review of respiratory disease*. 1987;136(3):570-4.
58. Hill AR, Premkumar S, Brustein S, Vaidya K, Powell S, Li PW, et al. Disseminated tuberculosis in the acquired immunodeficiency syndrome era. *The American review of respiratory disease*. 1991;144(5):1164-70.
59. Pollock KM, Montamat-Sicotte DJ, Grass L, Cooke GS, Kapembwa MS, Kon OM, et al. PD-1 Expression and Cytokine Secretion Profiles of *Mycobacterium tuberculosis*-Specific CD4+ T-Cell Subsets; Potential Correlates of Containment in HIV-TB Co-Infection. *PloS one*. 2016;11(1):e0146905.
60. Badri M, Ehrlich R, Wood R, Pulerwitz T, Maartens G. Association between tuberculosis and HIV disease progression in a high tuberculosis prevalence area. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2001;5(3):225-32.
61. Goletti D, Weissman D, Jackson RW, Graham NM, Vlahov D, Klein RS, et al. Effect of *Mycobacterium tuberculosis* on HIV replication. Role of immune activation. *J Immunol*. 1996;157(3):1271-8.
62. Nakata K, Rom WN, Honda Y, Condos R, Kanegasaki S, Cao Y, et al. *Mycobacterium tuberculosis* enhances human immunodeficiency virus-1 replication in the lung. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997;155(3):996-1003.
63. Zhang Y, Nakata K, Weiden M, Rom WN. *Mycobacterium tuberculosis* enhances human immunodeficiency virus-1 replication by transcriptional activation at the long terminal repeat. *The Journal of clinical investigation*. 1995;95(5):2324-31.
64. Crespo MP, Heli Corral R, Alzate A, Carrasquilla G, Sanchez N. [Mycobacterial infections in HIV-infected patients in Cali, Colombia]. *Rev Panam Salud Publica*. 1999;6(4):249-55.
65. Murcia MI, Leon CI, de la Hoz F, Saravia J. [Mycobacteria-HIV/AIDS association in patients attending a teaching-hospital in Bogota, Colombia]. *Revista de salud publica (Bogota, Colombia)*. 2007;9(1):97-105.
66. Murcia-Aranguren MI, Gomez-Marin JE, Alvarado FS, Bustillo JG, de Mendivelson E, Gomez B, et al. Frequency of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria in HIV infected patients from Bogota, Colombia. *BMC infectious diseases*. 2001;1:21.
67. Garcia I, Merchan A, Chaparro PE, Lopez LE. [Overview of the HIV/tuberculosis coinfection in Bogota, Colombia, 2001]. *Biomedica*. 2004;24 Suppl 1:132-7.
68. Arenas NE, Ramirez N, González G, Rubertone S, García AM, Gómez-Marín JE, et al. Estado de la coinfección tuberculosis/virus de la inmunodeficiencia humana en el municipio de Armenia (Colombia): experiencia de 10 años. *Infectio Asociación Colombiana de Infectología*. 2012;16(3):140-7.
69. Nunn P, Reid A, De Cock KM. Tuberculosis and HIV infection: the global setting. *The Journal of infectious diseases*. 2007;196 Suppl 1:S5-14.
70. Company BDa. BD BACTEC MGIT 960 SIRE kits for the antimycobacterial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. In: Company BDa, editor. Sparks, MD, USA: BD2005.
71. Ugarte-Gil C, Ponce Alvarez M, Moore DAJ. Pruebas de sensibilidad para *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Médica Peruana*. 2008;25:171-5.
72. Ritacco V, Iglesias MJ, Ferrazoli L, Monteserin J, Dalla Costa ER, Cebollada A, et al. Conspicuous multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* cluster strains do not trespass country borders in Latin America and Spain. *Infect Genet Evol*. 2012;12(4):711-7.
73. Banu S, Rahman SM, Khan MS, Ferdous SS, Ahmed S, Gratz J, et al. Discordance across several methods for drug susceptibility testing of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a single laboratory. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(1):156-63.
74. Wong P, Puray M, Gonzales A, Sevilla CR. Epidemiología molecular de la tuberculosis en el Perú. *Revista Peruana de Epidemiología*. 2011;15(1):1-11.

75. Bouklata N, Supply P, Jaouhari S, Charof R, Seghrouchni F, Sadki K, et al. Molecular Typing of Mycobacterium Tuberculosis Complex by 24-Locus Based MIRU-VNTR Typing in Conjunction with Spoligotyping to Assess Genetic Diversity of Strains Circulating in Morocco. *PLoS one*. 2015;10(8):e0135695.
76. García-Pachón E, Rodríguez JC. Epidemiología molecular de la tuberculosis: principales hallazgos y su aplicación en España. *Archivos de Bronconeumología*. 2005;41(11):618-24.
77. Drobniewski F, Balabanova Y, Nikolayevsky V, Ruddy M, Kuznetsov S, Zakharova S, et al. Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia. *Jama*. 2005;293(22):2726-31.
78. Gillespie SH, McHugh TD, Newport LE. Specificity of IS6110-based amplification assays for Mycobacterium tuberculosis complex. *Journal of clinical microbiology*. 1997;35(3):799-801.
79. Cave MD, Eisenach KD, McDermott PF, Bates JH, Crawford JT. IS6110: conservation of sequence in the Mycobacterium tuberculosis complex and its utilization in DNA fingerprinting. *Molecular and cellular probes*. 1991;5(1):73-80.
80. Cave MD, Eisenach KD, Templeton G, Salfinger M, Mazurek G, Bates JH, et al. Stability of DNA fingerprint pattern produced with IS6110 in strains of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*. 1994;32(1):262-6.
81. Sola C, Horgen L, Goh KS, Rastogi N. Molecular fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis on a Caribbean island with IS6110 and DRr probes. *Journal of clinical microbiology*. 1997;35(4):843-6.
82. Seidler A, Nienhaus A, Diel R. The transmission of tuberculosis in the light of new molecular biological approaches. *Occupational and environmental medicine*. 2004;61(2):96-102.
83. Lillebaek T, Dirksen A, Vynnycky E, Baess I, Thomsen VO, Andersen AB. Stability of DNA patterns and evidence of Mycobacterium tuberculosis reactivation occurring decades after the initial infection. *The Journal of infectious diseases*. 2003;188(7):1032-9.
84. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, et al. Restricted structural gene polymorphism in the Mycobacterium tuberculosis complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(18):9869-74.
85. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science (New York, NY)*. 1999;284(5419):1520-3.
86. Gordon SV, Brosch R, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Cole ST. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Molecular microbiology*. 1999;32(3):643-55.
87. Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S, et al. Variable host-pathogen compatibility in Mycobacterium tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(8):2869-73.
88. Hershberg R, Lipatov M, Small PM, Sheffer H, Niemann S, Homolka S, et al. High functional diversity in Mycobacterium tuberculosis driven by genetic drift and human demography. *PLoS biology*. 2008;6(12):e311.
89. Balcells ME, Garcia P, Meza P, Pena C, Cifuentes M, Couvin D, et al. A first insight on the population structure of Mycobacterium tuberculosis complex as studied by spoligotyping and MIRU-VNTRs in Santiago, Chile. *PLoS one*. 2015;10(2):e0118007.
90. Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M, et al. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of Mycobacterium tuberculosis with modern humans. *Nature genetics*. 2013;45(10):1176-82.
91. Demay C, Liens B, Burguiere T, Hill V, Couvin D, Millet J, et al. SITVITWEB--a publicly available international multimarker database for studying Mycobacterium tuberculosis genetic diversity and molecular epidemiology. *Infect Genet Evol*. 2012;12(4):755-66.
92. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, et al. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC microbiology*. 2006;6:23.
93. van Soolingen D, Hermans PW. Epidemiology of tuberculosis by DNA fingerprinting. *The European respiratory journal*. 1995;20:649s-56s.
94. Bhanu NV, van Soolingen D, van Embden JD, Dar L, Pandey RM, Seth P. Predominance of a novel Mycobacterium tuberculosis genotype in the Delhi region of India. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. 2002;82(2-3):105-12.
95. Kallenius G, Koivula T, Ghebremichael S, Hoffner SE, Norberg R, Svensson E, et al. Evolution and clonal traits of Mycobacterium tuberculosis complex in Guinea-Bissau. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37(12):3872-8.
96. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martin C, et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of Mycobacterium tuberculosis

- complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37(8):2607-18.
97. Filliol I, Driscoll JR, Van Soolingen D, Kreiswirth BN, Kremer K, Valetudie G, et al. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerging infectious diseases*. 2002;8(11):1347-9.
 98. Sebban M, Mokrousov I, Rastogi N, Sola C. A data-mining approach to spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioinformatics* (Oxford, England). 2002;18(2):235-43.
 99. Bos KI, Harkins KM, Herbig A, Coscolla M, Weber N, Comas I, et al. Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. *Nature*. 2014;514(7523):494-7.
 100. Duchene V, Ferdinand S, Filliol I, Guegan JF, Rastogi N, Sola C. Phylogenetic reconstruction of *Mycobacterium tuberculosis* within four settings of the Caribbean region: tree comparative analyse and first appraisal on their phylogeography. *Infect Genet Evol*. 2004;4(1):5-14.
 101. Cortinas MN, Fernandez M, Valeta MI, Uriarte MdR, Mogdsy MC. Caracterización genotípica de 80 cepas del género *Mycobacterium* en Uruguay. *Revista Médica del Uruguay*. 2002;18(3):230-8.
 102. 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. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(10):3563-71.
 103. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*. 2008;456(7218):53-9.
 104. Barnes PF, Cave MD. Molecular epidemiology of tuberculosis. *The New England journal of medicine*. 2003;349(12):1149-56.
 105. Groenen PM, Bunschoten AE, van Soolingen D, van Embden JD. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Molecular microbiology*. 1993;10(5):1057-65.
 106. Beggs ML, Cave MD, Marlowe C, Cloney L, Duck P, Eisenach KD. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex direct repeat sequence for use in cycling probe reaction. *Journal of clinical microbiology*. 1996;34(12):2985-9.
 107. Shabbeer A, Ozcaglar C, Yener B, Bennett KP. Web tools for molecular epidemiology of tuberculosis. *Infect Genet Evol*. 2012;12(4):767-81.
 108. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of clinical microbiology*. 1997;35(4):907-14.
 109. Acosta-Salinas R, Estrada-Chávez G, Milián-Suazo F. Genotyping methods for *Mycobacterium bovis*. *Review. Técnica Pecuaria en México*. 2009;47(4):389-412.
 110. Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular microbiology*. 2000;36(3):762-71.
 111. Supply P, Magdalena J, Himpens S, Locht C. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Molecular microbiology*. 1997;26(5):991-1003.
 112. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*. 1985;314(6006):67-73.
 113. Keim P, Klevytska AM, Price LB, Schupp JM, Zinser G, Smith KL, et al. Molecular diversity in *Bacillus anthracis*. *Journal of applied microbiology*. 1999;87(2):215-7.
 114. Klevytska AM, Price LB, Schupp JM, Worsham PL, Wong J, Keim P. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(9):3179-85.
 115. Le Fleche P, Hauck Y, Onteniente L, Prieur A, Denoeud F, Ramière V, et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC microbiology*. 2001;1:2.
 116. Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology*. 1998;144 (Pt 5):1189-96.
 117. Salud OPdI. Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis Organización Panamericana de la Salud - Organización Mundial de la Salud 2008 2008. Report No.
 118. Crudu V, Stratan E, Romancenco E, Allerheiligen V, Hillemann A, Moraru N. First evaluation of an improved assay for molecular genetic detection of tuberculosis as well as rifampin and isoniazid resistances. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(4):1264-9.
 119. Supply P. Multilocus Variable Number Tandem Repeat Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. Technical Guide. Institut de Biologie/Institut Pasteur de Lille. 2005:74.
 120. Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harmsen D. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic acids research*. 2010;38(Web Server issue):W326-31.

121. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of clinical microbiology*. 1988;26(11):2465-6.
122. Shamputa IC, Jugheli L, Sadradze N, Willery E, Portaels F, Supply P, et al. Mixed infection and clonal representativeness of a single sputum sample in tuberculosis patients from a penitentiary hospital in Georgia. *Respiratory research*. 2006;7:99.
123. WHO. Global tuberculosis report 2014. Switzerland: World Health Organization, 2014.
124. Ministerio de Salud. Resolución Número 1078 de 2000, (2000).
125. Lopez-Alvarez R, Badillo-Lopez C, Cerna-Cortes JF, Castillo-Ramirez I, Rivera-Gutierrez S, Helguera-Repetto AC, et al. First insights into the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from HIV-infected Mexican patients and mutations causing multidrug resistance. *BMC microbiology*. 2010;10:82.
126. Martinson NA, Hoffmann CJ, Chaisson RE. Epidemiology of tuberculosis and HIV: recent advances in understanding and responses. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2011;8(3):288-93.
127. Peñuela-Epalza M V-BM, Collazos-Daza J, De La Rosa-Barraza K, Hernández-Tapia H, Yanes-Miranda Y. Factores asociados a la coinfección VIH/SIDA- tuberculosis. *Salud Uninorte* 2006;22(1):5-19.
128. Schmaltz CA, Santoro-Lopes G, Lourenco MC, Morgado MG, Velasque Lde S, Rolla VC. Factors impacting early mortality in tuberculosis/HIV patients: differences between subjects naive to and previously started on HAART. *PloS one*. 2012;7(9):e45704.
129. Taha M, Deribew A, Tessema F, Assegid S, Duchateau L, Colebunders R. Risk Factors of Active Tuberculosis in People Living with HIV/AIDS in Southwest Ethiopia: A Case Control Study. *Ethiopian journal of health sciences*. 2011;21(2):131-9.
130. Reyes Corcho A, Díaz Jidy M, Pérez Rodríguez A, Bouza Jiménez Y, Bouza Jiménez Y. Factores asociados con la presencia de tuberculosis en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida en Cuba. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 2004;15:341-7.
131. Villarroel L, Rabagliati R, Balcells ME, Karzulovic L, Pérez C. Tuberculosis en individuos con infección por VIH en Chile: Estudio de prevalencia e impacto sobre mortalidad. *Revista médica de Chile*. 2008;136:578-86.
132. Laguardia J, Merchán-Hamann E. Factores de riesgo para la enfermedad tuberculosa en los casos de sida notificados en Brasil, 1980 a 2000. *Revista Española de Salud Pública*. 2003;77:553-65.
133. Lawn SD, Kranzer K, Wood R. Antiretroviral therapy for control of the HIV-associated tuberculosis epidemic in resource-limited settings. *Clinics in chest medicine*. 2009;30(4):685-99, viii.
134. Jones JL, Hanson DL, Dworkin MS, DeCock KM, Adult/Adolescent Spectrum of HIV/DG. HIV-associated tuberculosis in the era of highly active antiretroviral therapy. The Adult/Adolescent Spectrum of HIV Disease Group. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000;4(11):1026-31.
135. Jones BE, Young SM, Antoniskis D, Davidson PT, Kramer F, Barnes PF. Relationship of the manifestations of tuberculosis to CD4 cell counts in patients with human immunodeficiency virus infection. *The American review of respiratory disease*. 1993;148(5):1292-7.
136. Varma JK, McCarthy KD, Tasaneeyapan T, Monkongdee P, Kimerling ME, Buntheoun E, et al. Bloodstream infections among HIV-infected outpatients, Southeast Asia. *Emerging infectious diseases*. 2010;16(10):1569-75.
137. Arthur G, Nduba VN, Kariuki SM, Kimari J, Bhatt SM, Gilks CF. Trends in bloodstream infections among human immunodeficiency virus-infected adults admitted to a hospital in Nairobi, Kenya, during the last decade. *Clin Infect Dis*. 2001;33(2):248-56.
138. Ahmad S, Mokaddas E, Al-Mutairi N, Eldeen HS, Mohammadi S. Discordance across Phenotypic and Molecular Methods for Drug Susceptibility Testing of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in a Low TB Incidence Country. *PloS one*. 2016;11(4):e0153563.
139. Yakus MA, Driscoll J, Lentz AJ, Sikes D, Hartline D, Metchock B, et al. Concordance between molecular and phenotypic testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates for resistance to rifampin and isoniazid in the United States. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(6):1932-7.
140. Lacoma A, Garcia-Sierra N, Prat C, Ruiz-Manzano J, Haba L, Roses S, et al. GenoType MTBDRplus assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical samples. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(11):3660-7.
141. Das S, Narayanan S, Hari L, Mohan NS, Somasundaram S, Selvakumar N, et al. Simultaneous infection with multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis* identified by restriction fragment length polymorphism analysis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2004;8(2):267-70.
142. Comas I, Chakravarti J, Small PM, Galagan J, Niemann S, Kremer K, et al. Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved. *Nature genetics*. 2010;42(6):498-503.
143. Gomes HM, Elias AR, Oelemann MA, Pereira MA, Montes FF, Marsico AG, et al. Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from patients residents of 11 states of Brazil. *Infect Genet Evol*. 2012;12(4):649-56.

144. Miranda SS, Carvalho Wda S, Suffys PN, Kritski AL, Oliveira M, Zarate N, et al. Spoligotyping of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the state of Minas Gerais, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2011;106(3):267-73.
145. Abadia E, Sequera M, Ortega D, Mendez MV, Escalona A, Da Mata O, et al. *Mycobacterium tuberculosis* ecology in Venezuela: epidemiologic correlates of common spoligotypes and a large clonal cluster defined by MIRU-VNTR-24. *BMC infectious diseases*. 2009;9:122.
146. Candia N, Lopez B, Zozio T, Carrivale M, Diaz C, Russomando G, et al. First insight into *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity in Paraguay. *BMC microbiology*. 2007;7:75.
147. Gonzalo X, Ambroggi M, Cordova E, Brown T, Poggi S, Drobniewski F. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*, Buenos Aires, Argentina. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(3):528-31.
148. Ritacco V, Lopez B, Ambroggi M, Palmero D, Salvadores B, Gravina E, et al. HIV infection and geographically bound transmission of drug-resistant tuberculosis, Argentina. *Emerging infectious diseases*. 2012;18(11):1802-10.
149. Cohen T, Murray M, Abubakar I, Zhang Z, Sloutsky A, Arteaga F, et al. Multiple introductions of multidrug-resistant tuberculosis into households, Lima, Peru. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(6):969-75.
150. Sheen P, Couvin D, Grandjean L, Zimic M, Dominguez M, Luna G, et al. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru and exploration of phylogenetic associations with drug resistance. *PloS one*. 2013;8(6):e65873.
151. Taype CA, Agapito JC, Accinelli RA, Espinoza JR, Godreuil S, Goodman SJ, et al. Genetic diversity, population structure and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru. *Infect Genet Evol*. 2012;12(3):577-85.
152. Barletta F, Otero L, Collantes J, Asto B, de Jong BC, Seas C, et al. Genetic variability of *Mycobacterium tuberculosis* complex in patients with no known risk factors for MDR-TB in the North-Eastern part of Lima, Peru. *BMC infectious diseases*. 2013;13:397.
153. Warren RM, Victor TC, Streicher EM, Richardson M, Beyers N, Gey van Pittius NC, et al. Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004;169(5):610-4.
154. Roring S, Brittain D, Bunschoten AE, Hughes MS, Skuce RA, van Embden JD, et al. Spacer oligotyping of *Mycobacterium bovis* isolates compared to typing by restriction fragment length polymorphism using PGRS, DR and IS6110 probes. *Veterinary microbiology*. 1998;61(1-2):111-20.
155. Goguet de la Salmoniere YO, Li HM, Torrea G, Bunschoten A, van Embden J, Gicquel B. Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology*. 1997;35(9):2210-4.
156. 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*. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(4):1398-406.
157. Oelemann MC, Diel R, Vatin V, Haas W, Rusch-Gerdes S, Loch C, 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. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(3):691-7.
158. Sola C, Filliol I, Legrand E, Lesjean S, Loch C, Supply P, et al. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infect Genet Evol*. 2003;3(2):125-33.
159. Lari N, Rindi L, Bonanni D, Rastogi N, Sola C, Tortoli E, et al. Three-year longitudinal study of genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Tuscany, Italy. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(6):1851-7.

ANEXOS

ANEXO 1. ENCUESTA APLICADA A LOS PACIENTES.

Detección de Tuberculosis y Micobacteriosis en individuos VIH positivos de los Hospitales Simón Bolívar y Santa Clara de Bogotá, en la era del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA)

Hospital Simón Bolívar	Hospital Santa Clara
Fecha (DD/MM/AAAA)	

1- Identificación paciente

1. Número del paciente en el estudio										
2. Nombres y apellidos										
3. Edad (en años cumplidos)			4. Sexo (Marque con una X)			Masculino		Femenino		
5. Número de Cedula de ciudadanía					6. Procedencia (Donde nació)					
7. Dirección habitual de residencia			7.1 Ciudad o municipio				7.2 Número telefónico/celular			
8. Afiliación al sistema de seguridad social (Marque con una X)		Régimen contributivo		Régimen Subsidiado		Régimen especial (Policía, Ejercito, Magisterio, Unisalud, etc)		Vinculado (SISBEN)		
9. Hospitalizado		No	Si	Servicio			10. Consulta externa (Marque con una X)		Si	No
11. ¿Está embarazada actualmente?		No sabe	No	Si	Semanas de gestación					
12. ¿A cuál raza usted pertenece? (Marque con una X)		Afro descendiente		Indígena		ROM/Gitano		Mestizo	Blanco	Otro
13. ¿Está usted privado de la libertad?			No			Si				
14. ¿Es usted habitante en situación de calle?			No			Si				
15. ¿Es usted residente en hogar geriátrico?			No			Si				
16. ¿Está usted en situación de desplazamiento?			No			Si				
17. ¿Actualmente tiene tos ?			No			Si				
18. ¿Ha tenido la tos por más de 2 semanas?			No			Si				
19. Presenta expectoración			No			Si				
20. ¿Cuándo se le diagnóstico VIH/SIDA? ()			Día			Meses			Año	
21. ¿Sabe cuál fue su último resultado de CD4? (confirmar con Historia clínica)			No	SI	Valor			Fecha		
22. ¿Sabe cuál fue su último resultado de Carga viral? (confirmar con Historia clínica)			No	SI	Valor			Fecha		
23. ¿Actualmente toma medicamentos antirretrovirales de gran actividad (TARGA) Para el VIH/SIDA? (Marque con una X)			No (Pase a la pregunta 24)			Si (Pase a la pregunta 25)				
24. ¿Por qué no está tomando los medicamentos antirretrovirales?										
25. ¿Cuáles medicamento antirretrovirales está tomando para el VIH/SIDA?										
26: Radiografía de tórax (En Historia clínica)			Si					No		
27. Resultado RX		(Transcriba el resultado)								

2- Antecedentes:

28. Cicatriz BCG (observe en el paciente)		No		Si	
29. ¿le han hecho la prueba de tuberculina?		No sabe		No	Si
30. ¿Alguna vez ha tenido tuberculosis?		No sabe		No	Si

Detección de Tuberculosis y Micobacteriosis en individuos VIH positivos de los Hospitales Simón Bolívar y Santa Clara de Bogotá, en la era del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA)

	(Pase a la pregunta 40)	(Pase a la pregunta 40)	(Pase a la pregunta 31)			
31. ¿Hace cuánto tiempo? (en meses)						
32. ¿Tomó tratamiento antituberculoso previo?	No sabe (Pase a la pregunta 38)	No (Pase a la pregunta 38)	Si (Pase a la pregunta 33)			
33. ¿Hace cuánto tiempo (en meses)?						
34. ¿Interrumpió el tratamiento antituberculosos?	No sabe (Pase a la pregunta 37)	No (Pase a la pregunta 37)	Si			
35. ¿Hace cuánto tiempo? (en meses)						
36. ¿Reinicio el tratamiento?	No sabe	No	Si			
37. ¿Completó el tratamiento antituberculoso?	No sabe	No	Si			
38. ¿Actualmente está tomando tratamiento antituberculoso?	No sabe (Pase a la pregunta 40)	No (Pase a la pregunta 40)	Si			
39. Mes y año de inicio de este tratamiento						
40. ¿Ha tenido Psoriasis?	No sabe	No	Si	Tiempo de evolución (meses)		
41. ¿Ha tenido Colagenosis?	No sabe	No	Si	Tiempo de evolución (meses)		
42. ¿Ha sufrido Criptococosis?	No sabe	No	Si	Hace cuanto (meses)		
43. ¿Ha sufrido Coccidiosis intestinal?	No sabe	No	Si	Hace cuanto (meses)		
44. ¿Ha sufrido Pneumocistosis?	No sabe	No	Si	Hace cuanto (meses)		
45. ¿Ha sufrido Hepatitis?	No sabe (Pase a la pregunta 47)	No (Pase a la pregunta 47)	Si			
46. Cual hepatitis ha sufrido	<ul style="list-style-type: none"> o o o 			Tiempo de evolución (meses)		
47. ¿Ha sufrido infecciones de transmisión sexual (sífilis, herpes genital, tricomoniasis)?	No sabe (Pase a la pregunta 49)	No (Pase a la pregunta 49)	Si			
48. ¿Que infección de trasmisión sexual ha sufrido?	<ul style="list-style-type: none"> o o 			Tiempo de evolución (meses)		
49. Otras enfermedades infecciosas previas asociadas al VIH	No sabe	No	Si	¿Cuáles? o o		
50. ¿Ha tenido o tiene Cáncer?	No sabe	No	Si	Órgano	Tiempo de evolución (meses)	
51. ¿Le han realizado algún trasplante?	No sabe	No	Si	Órgano	Fecha (DD/MM/AAAA)	
52. ¿Tiene Diabetes Mellitus?	No sabe	No	Si	Tipo I	Tipo II	Tiempo de evolución (meses)
53. ¿Ha tenido LUPUS?	No sabe	No	Si	Tiempo de evolución (meses)		
54. ¿Ha tenido Artritis Reumatoidea?	No sabe	No	Si	Tiempo de evolución (meses)		
55. ¿Ha tenido Sarcoidosis?	No sabe	No	Si	Tiempo de evolución (meses)		
56. ¿Ha tenido Sjögren	No sabe	No	Si	Tiempo de evolución (meses)		

Detección de Tuberculosis y Micobacteriosis en individuos VIH positivos de los Hospitales Simón Bolívar y Santa Clara de Bogotá, en la era del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA)

57. ¿Ha tenido Espondilitis Anquilosante?	No sabe	No	Si	Tiempo de evolución (meses)
58. ¿Ha tenido Síndrome antifosfolípido?	No sabe	No	Si	Tiempo de evolución (meses)
59. Ha recibido terapia oral o parenteral de corticosteroides (prednisolona, betametasona, hidrocortisona, cortisona, dexametasona, metilprednisolona, triamcinolona)	No sabe	No	Si	
60. Ha recibido tratamiento biológico (Anti-TNF, infliximab, adalimumab y etanercept)	No sabe	No	Si	
61. ¿Usted consume sustancias psicoactivas como por ejemplo marihuana, bazuco, cocaína, inhalantes, pegante, heroína?	No sabe (Pase a la pregunta 63)	No (Pase a la pregunta 63)	Si	
62. ¿Cuales sustancias psicoactivas consume?	Otras, cuáles?			
63. ¿Usted fuma tabaco como el cigarrillo?	No sabe (Pase a la pregunta 66)	No (Pase a la pregunta 66)	Si	
64. ¿Hace cuanto tiempo fuma?	meses			
65. ¿Con que frecuencia usted fuma en el mes?				
66. ¿Usted consume bebidas alcohólicas?	No sabe (Pase a la pregunta 69)	No (Pase a la pregunta 69)	Si	
67. ¿Hace cuanto tiempo consume bebidas alcohólicas?	meses			
68. ¿Con que frecuencia usted consume bebidas alcohólicas al mes?				

3- Hallazgos clínicos:

Síntomas relacionados con la presencia de tuberculosis y/o micobacteriosis (PREGUNTAR si el síntoma lo tiene en el momento de la consulta y marcar con una X)

Síntomas	No	Si	Tiempo de evolución (días)
69. Fiebre			
70. Tos			
71. Expectoración			
72. Pérdida de peso			
73. Sudoración nocturna			
74. Adenopatías			
75. Hematuria			
76. Hemoptisis			
77. Cefalea			
78. Dolor abdominal			
79. Diarrea			
80. Estreñimiento			
81 Otros			Cuál?
Signos			
82. Peso (Kilogramos)			
83. Talla (centímetros)			
84. Temperatura axilar (centígrados)			
85. Tensión arterial			

ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto: Detección de Tuberculosis y Micobacteriosis en individuos VIH positivos de los Hospitales Simón Bolívar y Santa Clara de Bogotá, en la era del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA)

Investigadores Responsables:

Martha Murcia¹, Carlos Parra¹, Myriam Navarrete¹, Angélica Knudson¹, Ricardo Sánchez², Ana María Granadas³, Oscar Briseño⁴, Oscar Cruz⁵

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia; ²Departamento de Psiquiatría Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia; ³Hospital Santa Clara, Bogotá; ⁴Hospital Simón Bolívar, Bogotá; ⁵Secretaría Distrital de Salud de Bogotá.

Apreciada señor/a:

Queremos invitarlo a usted a participar voluntariamente en el estudio titulado "Detección de Tuberculosis y Micobacteriosis en individuos VIH positivos de los Hospitales Simón Bolívar y Santa Clara de Bogotá, en la era del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA)", para lo cual solicitamos su autorización.

Este documento, que le entregaremos para que lo conserve, contiene la información necesaria para que usted pueda decidir libremente si desea participar en el estudio. A continuación lo leeremos a usted y le solicitamos el favor de que escuche cuidadosamente y haga todas las preguntas que estime convenientes antes de informarnos su decisión. El presente consentimiento informado ha sido elaborado teniendo en cuenta los requisitos consignados en el Artículo 15 y siguientes de la Resolución No 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de la República de Colombia.

-¿Qué es la tuberculosis y las micobacteriosis y que efectos tienen en la salud?

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa producida por una bacteria llamada *Mycobacterium tuberculosis*, que va a infectar de preferencia los pulmones y que presenta como síntomas tos y/o expectoración por más de 2 semanas, además fiebre, pérdida de peso y sudoración nocturna. La tuberculosis se transmite de enfermo a sano por vía respiratoria, el enfermo al toser lanza al aire millones de bacterias que son aspiradas por los contactos, entre más cercano sea el contacto (vivir en la misma casa, dormir en un mismo cuarto y en la misma cama) más fácil será el contagio. Es bien conocido que la infección causada por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) incrementa el riesgo de tuberculosis y micobacteriosis y se sabe que la coinfección TB/VIH y/o Micobacterias No Tuberculosas (MNT) /VIH se asocian con una mortalidad alta. Los pacientes infectados por el VIH a menudo presentan formas extrapulmonares de TB con escasa cantidad de bacilos, lo que hace que los métodos convencionales de diagnóstico sean por lo general negativos. El objetivo de este estudio es la búsqueda de casos de tuberculosis y micobacteriosis entre las personas que conviven con el VIH/Sida (PVVS), empleando diferentes pruebas diagnósticas, que permitan establecer un sistema de puntuación que proporcione un diagnóstico rápido y fiable de la infección tuberculosa y de la enfermedad. Mediante la prueba de Tuberculina y QuantiFERON® se pretende evaluar la exposición de los individuos a la bacteria.

-¿Qué deseamos hacer?

El grupo de investigación MICOBAC-UN de la Universidad Nacional de Colombia esta interesado en conocer cuántos individuos infectados por el VIH tienen la infección tuberculosa latente y cuántos padecen una tuberculosis activa y/o micobacteriosis y además conocer cuáles son sus síntomas. También se pretende evaluar qué pruebas diagnósticas son las más sensibles para poder construir un sistema de puntuación, que le permita al Médico contar con un diagnóstico rápido y seguro.

-¿Cómo haremos el estudio y cómo sería su participación en él?

Para saber todo esto estamos realizando el estudio titulado "Detección de Tuberculosis y Micobacteriosis en individuos VIH positivos de los Hospitales Simón Bolívar y Santa Clara de Bogotá, en la era del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA)".

Para poder realizar el estudio deseamos hacer lo siguiente:

- 1- Después de hablar con el paciente adulto se le aplicará una encuesta y la "prueba de tuberculina", que consiste en la aplicación en el brazo de 0,1ml (aproximadamente una gota) de un producto mundialmente aceptado para detectar el contacto previo con la bacteria.
- 2- Se le tomarán 2 ml de sangre periférica en dos tubos propios de la prueba de QuantiFERON.
- 3- Se le solicitará que recoja 3 muestras de esputo. En caso que no las pueda recolectar le podrán recolectar un esputo inducido o mediante fibrobroncoscopio.
- 4- De acuerdo a su sintomatología se le podrá solicitar que recoja muestras de orina y/o material fecal en frascos de plástico suministrados por el proyecto.
- 5- De acuerdo a su sintomatología le podrán tomar muestras de tejidos mediante biopsia o muestras de líquidos: cefalorraquídeo, pleural, pericárdico, etc.
- 6- Todas las muestras serán procesadas en el Laboratorio de Micobacterias de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.
- 7- En caso de ser positivo el examen de esputo o de cualquier otra muestra el hospital le administrará el tratamiento TAES/DOTS correspondiente.

- Riesgos de su participación en el estudio

La toma de muestra de esputo, materia fecal, orina, no representa ningún riesgo para su integridad física. La toma de la muestra de sangre puede producir en algunas personas algo de mareo, del cual la persona se recuperará rápidamente con algo de reposo. El procedimiento de toma de sangre se hará bajo condiciones de estricta limpieza para disminuir el riesgo de una infección. La prueba de

tuberculina tiene un riesgo mínimo de una reacción alérgica. Ambas pruebas tienen una baja probabilidad de generar molestias a lo sumo algo de dolor, en el caso de la tuberculina producto de la inflamación en el sitio de la prueba. En caso de que tuviese lugar alguna molestia, reacción alérgica o adversa, personal especializado del hospital le brindará sin ningún costo el tratamiento adecuado con el fin de corregir cualquier alteración que se derive de estos procedimientos.

La toma de la muestra de sangre representa un riesgo mínimo para usted cuando es tomada por personal calificado al igual que la aplicación de la prueba de tuberculina.

La toma de muestras mediante broncoscopio (cepillado bronquial, lavado broncoalveolar, biopsia transbronquial); biopsias de tejidos, aspirado de líquidos biológicos mediante punción percutánea (líquido cefalorraquídeo tomado por punción lumbar, líquido peritoneal, pericárdico, pleural, articular), tienen un riesgo mayor al mínimo, son procedimientos médicos que le deben practicar **participe o no en el estudio** y serán tomadas en todos los casos por los especialistas del hospital.

¿Qué experimentará durante y después del procedimiento mediante broncoscopio? ¿Cuáles son los riesgos?

Hasta que el anestésico comience a obrar, puede sentir que el líquido baja por detrás de la garganta y tiene necesidad de toser o hacer arcadas. Una vez que la anestesia surte efecto, puede experimentar sensaciones de presión o tirón leve a medida que la sonda se desplaza a través de la tráquea. Aunque muchos pacientes sienten como si se fueran a ahogar cuando la sonda está en la garganta, no hay riesgo de asfixia. Cuando el efecto de la anestesia haya pasado, la garganta puede sentirse áspera durante algunos días. El reflejo de la tos retorna 1 ó 2 horas después del examen y hasta entonces no se le permite comer ni beber.

Los principales riesgos de la Broncoscopia son: sangrado en los sitios de las biopsias, infección. También existe un pequeño riesgo de: arritmias, ataque cardíaco, nivel bajo de oxígeno en la sangre, neumotórax. Cuando se toma una biopsia, puede presentarse riesgo de hemorragia. Es común que haya un poco de sangrado, pero el Médico o la enfermera se encargarán de vigilar su estado de salud. No debe ingerir ningún alimento o líquido, incluso agua, antes de que desaparezca el efecto de la anestesia.

¿Qué experimentará durante y después del procedimiento de LCR ¿Cuáles son los riesgos?

Podrá sentir malestar de mínimo a moderado. Sentirá picazón cuando se inyecta la anestesia. Los riesgos son: dolor de cabeza, dolor de espalda, sangrado, dolor o ardor anormal, sensación punzante u hormigueo en las piernas, reacción alérgica a la anestesia, infección. Cualquier malestar que se presente será atendido por el personal médico del hospital.

¿Qué experimentará durante y después del procedimiento mediante broncoscopio? ¿Cuáles son los riesgos?

La biopsia es un procedimiento quirúrgico menor en el cual un médico toma una muestra de tejido de una zona determinada. El médico le brindará las indicaciones previas al estudio cuando sea necesario. Las posibles complicaciones pueden incluir infecciones, moretones y sangrado. Las complicaciones serán atendidas por el personal médico del hospital.

-Beneficios de su participación en el estudio.

Todas las pruebas de laboratorio que se le realicen a usted, así como los medicamentos que se le administren en caso de ser positivo, y la atención médica prestada serán gratis. Ni usted ni su familia tendrán que pagar por ellos.

- Confidencialidad

Los resultados de este estudio ingresarán a la base de datos de los investigadores de la Universidad Nacional y el Comité de Ética lo supervisará, estos datos serán confidenciales. Si la información derivada del estudio se publica o presenta en reuniones científicas, no se usará su nombre ni ningún otro tipo de información personal, en su lugar se utilizará códigos. Su información personal y los resultados serán mantenidas con total confidencialidad y bajo llave. La información acerca de usted no será compartida ni entregada a nadie, excepto a entidades de control y vigilancia que podrían tener acceso a esta información con fines de garantizar el adecuado manejo de la información y desarrollo del estudio.

- Derechos de los participantes

Su participación es completamente libre, voluntaria y gratuita. Si usted decide rechazar esta invitación a participar ó retirarse voluntariamente del estudio en cualquier momento, ello no afectará la atención que usted reciba en las entidades de salud, ni perderá ninguno de los beneficios que le corresponden por Ley. Las muestras tomadas no serán utilizadas para ningún otro estudio sin su consentimiento.

- Personas que pueden darle información adicional

Si usted ahora ó en cualquier otro momento desea hacer una consulta sobre el estudio puede contactar a las siguientes personas:
Dra Martha Murcia Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. Teléfono: 3165000 Ext 15016, 15014 Bogotá, D.C; Dr Carlos Parra. Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. Teléfono: 3165000 Ext 15016, 15039 Bogotá, D.C.

- Protección de sus derechos y seguridad

Para garantizar la protección de sus derechos y seguridad, este estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Nacional de Colombia.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto: Detección de Tuberculosis y Micobacteriosis en individuos VIH positivos de los Hospitales Simón Bolívar y Santa Clara de Bogotá, en la era del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA)

Si usted autoriza su participación, por favor complete los siguientes datos y conserve una copia de este documento.

Yo, _____
Nombre completo de la persona que entrega el consentimiento

Declaro que se me han leído y explicado detalladamente, y que he comprendido los objetivos, los procedimientos y demás aspectos relacionados con este estudio y que tuve la posibilidad de hacer preguntas para aclarar mis dudas.

Acepto voluntariamente mi participación en el estudio. En constancia, firmo a continuación:

Firma de la persona que entrega el consentimiento

Cédula de Ciudadanía No. _____

Fecha: Día (____) Mes (____) Año (____)

Nombre completo del profesional que obtuvo el consentimiento

Firma del profesional que obtuvo el consentimiento

Cédula de Ciudadanía No. _____

Fecha: Día (____) Mes (____) Año (____)

Testigo 1 Testigo 2

Nombre: _____ Nombre: _____

Firma: _____ Firma: _____

BENEFICIOS ADICIONALES

Detección de Tuberculosis y Micobacteriosis en individuos VIH positivos de los Hospitales Simón Bolívar y Santa Clara de Bogotá, en la era del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA)

La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podría ayudar en el futuro a entender las causas y/o el comportamiento de la(s) entidad(es) anteriormente mencionada(s). Se puede dar el caso en donde usted y su familia no se beneficien directamente de estos estudios, pero tanto su familia como otros individuos afectados podrían beneficiarse. Por lo tanto, por favor marque su decisión con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores:

Deseo que la muestra que me fue extraída sea DESECHADA una vez completado el estudio.

Autorizo conservar la muestra que me fue extraída con la posibilidad de emplearla junto con el resultado del estudio, en las situaciones señaladas a continuación:

- En estudios complementarios de diagnóstico para mí o algún miembro de mi familia: Si No
- En estudios de investigación específicos para la (s) entidad (es), objeto de esta toma de muestra y para el mejoramiento de técnicas diagnósticas en Microbiología siempre y cuando se conserve en anonimato mis datos de identificación: Si No
- En líneas de investigación similares a la de éste proyecto previa autorización del Comité de Ética. Si No

ANEXO 3. HIBRIDACIÓN DE SPOLIGOTYPING

Recomendaciones:

- Limpiar previamente el miniblotter con jabón y cepillo, preferiblemente un día antes de su uso.
- Nunca tocar la membrana con guantes, siempre usar pinzas
- El SDS debe usarse máximo una semana de su preparación. Su uso es de importancia crítica durante el procedimiento.

Procedimiento:

1. Se precalentaron los baños serológicos a 42°C y 60°C, y el horno de hibridación Techne Hybridiser modelo HB-1D a: 60°C
2. Se prepararon los siguientes buffers (cantidades para una membrana):
 - 250 mL 2XSSPE/0,1% SDS, 60°C.
 - 500 mL 2XSSPE/0,5% SDS 60°C.
 - 250 mL 2xSSPE/0,5% SDS, 42°C.
 - 500 mL 2xSSPE, temperatura ambiente.
3. Se agregaron 150 µL de 2xSSPE/0,1 SDS a los productos de PCR.
4. Se denaturaron los productos de PCR durante 10 minutos a 99°C. Se colocaron inmediatamente en hielo.
5. Se lavó la membrana con 2xSSPE/0,1% SDS a 60°C durante 5 minutos.
6. Se colocaron la membrana Ocium Biosolutions y una espuma amortiguadora en el miniblotter, se alineó la franja azul de la membrana con los pozos del miniblotter para que queden de manera perpendicular a los oligonucleótidos.
7. Se extrajo el exceso de líquido de lavado por aspiración con la bomba de vacío.
8. Se colocaron 140 µL del producto de PCR diluido en cada pozo sin burbujas de aire. Los pozos sobrantes se llenaron con 2xSSPE/0,1% SDS.
9. Se realizó la hibridación a 60°C durante una hora en la superficie plana del horno de hibridación.
10. Al terminar la incubación, las muestras fueron removidas del miniblotter con la bomba de vacío.
11. Con una pinza se tomó la membrana del miniblotter y se lavó dos veces la con 2xSSPE/0,5% SDS a 60°C durante 10 minutos. (Nota: para bajar la temperatura del horno de hibridación rápidamente, se programó a 42°C, se apagó y se dejó la puerta abierta).

12. Se transfirió cuidadosamente la membrana a una botella cilíndrica (especial para usar en el horno de hibridación) y se esperó a que se enfriara para evitar la inactivación de la peroxidasa.
13. Se colocó la solución del conjugado (2,5 μ L estreptavidina-peroxidasa Roche + 10 mL de 2xSSPE/0,5% SDS), se incubó a 42°C durante 1 hora.
14. La membrana se lavó dos veces en 250 mL de 2xSSPE/0,5% SDS por 10 min a 42°C.
15. Se lavó nuevamente la membrana dos veces en 250 mL de 2xSSPE por 5 min a temperatura ambiente.
16. Se preparó la solución de sustrato de 5 mL de A + 5 mL de B e incubó la membrana a temperatura ambiente.
17. Se cubrió la membrana con una hoja transparente y encima se colocó la película autoradiográfica (El tiempo depende de la calidad de los Rx (2 min)).
18. Colocar la placa en el equipo de revelado.

ANEXO 4. PREPARACIÓN DE LAS MEZCLAS DE PCR PARA CADA LOCI MIRU

REACTIVO (Concentración stock)	MIRU 04	MIRU 26	MIRU 40	Mtub 30 (VNTR 47)	Mtub 39 (VNTR 52)	QUB-4156 (VNTR 53)	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 31	Mtub 29 (VNTR 46)	VNTR 48 (ETR-B)	Mtub 34 (VNTR 49)	MIRU 20	MIRU 24	MIRU 27	Mtub04 (VNTR 42)	VNTR 43 (ETR-C)	VNTR ETR-A	QUB-11b	Mtub 21 (1955)	QUB-26	MIRU 02	MIRU 23	MIRU 39
Concentración final MgCl ₂	3mM	3mM			3mM	2mM				1,5 Mm				1,5 Mm		2,5mM								
Agua MQ	3,2	4,5			2,2	4,9				5,1				3,8		4,7								
Buffer 10X	1	1			1	1				1				1		1								
Q 5X	2	2			2	2				2				2		2								
MgCl ₂ 25mM	0,6	0,6			0,6	0,2				0				0,0		0,4								
dNTPs 5mM	0,4	0,4			0,4	0,4				0,4				0,4		0,4								
Primers 5pmoles	1,5	0,2			2,5	0,2				0,2				1,5		0,2								
Taq DNA polymerase QIAGEN 5 units/μl	0,04	0,04			0,04	0,04				0,04				0,04		0,04								
Total Mezcla	8,7	8,7			8,7	8,7				8,7				8,7		8,7								
ADN	1,3	1,3			1,3	1,3				1,3				1,3		1,3								
Volumen Total	10	10,0			10	10,0				10,0				10,0		10,0								

Las PCRs fueron realizadas por grupos de primers de acuerdo a la concentración de MgCl₂ y cantidad de primer

ANEXO 5. CUADRO GUÍA DE VARIACIÓN ALÉLICA Y GENOTIPO DE H37RV/RA

Locus	MIRU 02	Mtub04	ETRC	MIRU 04	MIRU 40	MIRU 10	MIRU 16	Mtub21	MIRU 20	QUB2163b	ETRA	Mtub29	Mtub30	ETRB	MIRU 23	MIRU 24	MIRU 26	MIRU 27	Mtub34	MIRU 31	Mtub39	QUB26	QUB4156	MIRU 39
Convention	154	424	577	580	802	960	1644	1955	2059	2163	2165	2347	2401	2461	2531	2687	2996	3007	3171	3192	3690	4052	4156	4348
Allele																								
0	402	537	171	175	354	482	565	116	437	67	195	335	252	347	150	395	285	498	326	492	272	153	563	540
1	455	588	208	252	408	537	618	149	514	136	270	392	305	404	200	447	336	551	380	545	330	264	622	593
2	508	639	266	329	462	590	671	206	591	205	345	449	363	461	253	501	387	604	434	598	388	375	681	646
3	561	690	324	406	516	643	724	263	668	274	420	506	421	518	306	555	438	657	488	651	446	486	740	699
4	614	741	382	483	570	696	777	320	745	343	495	563	479	575	359	609	489	710	542	704	504	597	799	752
5	667	792	440	560	624	749	830	377	822	412	570	620	537	632	412	663	540	763	596	757	562	708	858	805
6	720	843	498	637	678	802	883	434	899	481	645	677	595	689	465	717	591	816	650	810	620	819	917	858
7	773	894	556	714	732	855	936	491	976	550	720	734	653	746	518	771	642	869	704	863	678	930	976	911
8	826	945	614	791	786	908	989	548	1053	619	795	791	711	803	571	825	693	922	758	916	736	1041	1035	964
9	879	996	672	868	840	961	1042	605	1130	688	870	848	769	860	624	879	744	975	812	969	794	1152	1094	1017
10	932	1047	730	945	894	1014	1095	662	1207	757	945	905	827	917	677	933	795	1028	866	1022	852	1263	1153	1070
11	985	1098	788	1022	948	1067	1148	719	1284	826	1020	962	885	974	730	987	846	1081	920	1075	910	1374	1212	1123
12	1038	1149	846	1099	1002	1120	1201	776	1361	895	1095	1019	943	1031	783	1041	897	1134	974	1128	968	1485	1271	1176
13	1091	1200	904	1176	1056	1173	1254	833	1438	964	1170	1076	1001	1088	836	1095	948	1187	1028	1181	1026	1596	1330	1229
14	1144	1251	962	1253	1110	1226	1307	890	1515	1033	1245	1133	1059	1145	889	1149	999	1240	1082	1234	1084	1707	1389	1282
15	1197	1302	1020	1330	1164	1279	1360	947	1592	1102	1320	1190	1117	1202	942	1203	1050	1293	1136	1287	1142	1818	1448	1335

variant alleles in MIRU 04 (strains H37Rv, H37Ra, BCG and <1% of clinical strains)

Allele	alias	MIRU 04
0'	0s	122
1'	1s	199
2'	2s	276
3'	3s	353
4'	4s	430
5'	5s	507
6'	6s	584
7'	7s	661
8'	8s	738
9'	9s	815

Locus	MIRU 02	MIRU 04	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 20	MIRU 23	MIRU 24	MIRU 26	MIRU 27	MIRU 31	MIRU 39	MIRU 40	Mtub04	ETRC	Mtub21	QUB2163b (QUB11b)	ETRA	Mtub29	Mtub30	ETRB	Mtub34	Mtub39	QUB26	QUB4156
Convention	154	580	960	1644	2059	2531	2687	2996	3007	3192	4348	802	424	577	1955	2163	2165	2347	2401	2461	3171	3690	4052	4156

H37Rv-Ra Genotype 2 3 3 2 2 6 1 3 3 3 2 1 2 4 2 5 3 4 2 3 3 5 5 2

ANEXO 6. CÁLCULO ÍNDICE DISCRIMINATORIO DE HUNTER GASTON (HGDI)

La fórmula utilizada fue la siguiente: (Anexo 5)

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

Donde:

N : Número total de aislados estudiados

S : Número de clusters obtenidos

n_j : número de aislados por cluster

Ejemplo del cálculo de HGDI en los datos de spoligotyping:

De las 49 cepas analizadas por spoligotyping se obtuvieron 13 patrones diferentes, el cluster 1 estuvo conformado por 2 cepas, el cluster 2 por 11, el cluster 3 por 10, el cluster 4 por 6, los clusters 5, 6 y 8, estuvieron conformados por dos cepas cada uno, el cluster 7 por 5 y el 9 por 3 cepas. Los 6 restantes tuvieron patrones únicos.

Entonces,

N : 49

S : 9

n_j : $n_1=2$, $n_2=11$, $n_3=10$, $n_4=6$, $n_5=2$, $n_6=2$, $n_7=5$, $n_8=2$, $n_9=3$

Aplicando la fórmula;

$$D = 1 - [(n_1 \times n_1 - 1) + n_2 \times n_2 - 1 + n_3 \times n_3 - 1 + n_4 \times n_4 - 1 + n_5 \times n_5 - 1 + n_6 \times n_6 - 1 + n_7 \times n_7 - 1 + n_8 \times n_8 - 1 + n_9 \times n_9 - 1] / [N \times N - 1]$$

$$D = 1 - [(2 \times 1 + 11 \times 10 + 10 \times 9 + 6 \times 5 + 2 \times 1 + 2 \times 1 + 5 \times 4 + 2 \times 1 + 3 \times 2)] / [49 \times 48]$$

$$D = 1 - (264/2352)$$

$$D = 1 - 0,112$$

$$D = 0,888$$

ANEXO 7. ABSTRACT DEL POSTER PRESENTADO EN EL 36TH ANNUAL CONGRESS OF THE EUROPEAN SOCIETY OF MYCOBACTERIOLOGY, JUNE 28TH TO JULY 1ST, 2015, EN RIGA (LATVIA)

Colombian individuals with HIV isn't a good tool in Colombia. We suggest including IGRA for higher detection of LTBI, however, the performance of QFT-GIT for diagnosis of LTBI is remarkably affected by cell counts lower to 500 CD4+cells/ μ L.

P136

MYCOBACTERIAL INFECTIONS IN HIV-INFECTED INDIVIDUALS IN BOGOTÁ, COLOMBIA

Juan Germán Rodríguez¹, Martha I Murcia¹, Maeda Beltrán², Francy Johanna Pérez Llanos², Liliana Sánchez², Carlos Parra-López¹, Myriam Navarrete¹, Angélica Knudson¹, Ricardo Sánchez²

¹Grupo Micobac-Un, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia

²Universidad Nacional de Colombia

³Departamento de Psiquiatría, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia

Introduction: Nowadays tuberculosis (TB) is the most important infectious disease worldwide and one of the major causes of mortality in people living with acquired immune deficiency syndrome (HIV/AIDS). In Colombia, with a national incidence of 25 cases by 100.000 people, in the year 2014 were reported 12.415 cases of TB, 2.029 cases of HIV/TB coinfection and 608 deaths by TB. *Mycobacterium avium* complex (MAC) infection is a common complication of advanced acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) disease and is an independent predictor of mortality and shortened survival. The objective of this study is to detect mycobacterial infection in HIV-infected patients with clinic suspicious of TB in two public hospitals in Bogota, Colombia.

Methodology: This is a descriptive cross-sectional study. Between October 2014 and October 2015 we expect to enroll 350 adults patients HIV-positive (over 18 years old), with clinical suspicious of TB. A total of 564 clinical specimens (mostly paired samples of blood, pulmonary) and extra-pulmonary samples were collected from 162 HIV positive patients. The samples were processed for acid-fast bacilli (AFB) stain, culture and Multiplex polymerase chain reaction HSP65-IS6110 PCR. Susceptibility test was determined by BACTEC MGIT 460 SIRE® methodology and Genotype MTBDRplus®

Results: In total 162 patients were enrolled up to now. 132/162 patients (81%) were men and 30 (19%) women (ratio male / female of 4.4:1), with an average age of 38 years. Overall 33 of 162 patients (20.4%) were positive for any *Mycobacterium* species by acid-fast staining or culture. *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) was identified in 24/162 patients (14%), *Mycobacterium avium* complex (MAC) was isolated in 4/162 individuals (2.5%) and two patients (1.2%) presented simultaneous infection by MTC and MAC. The AFB smear was positive in 28/240

(12%) samples. Among 92 clinical samples tested by PCR Multiplex six (6.5%) were positive for HSP65-6110. Drug susceptibility performed in 10 cultures of MTC demonstrated that one (10%) was multidrug resistant (MDR). 29 clinical specimens evaluated by MTBDRplus Genotype Ver2.0®, 14 (48%) were positive for MTC, 13 were sensitive to isoniazid and rifampicin (93%), while 1 (7%) was sensitive to isoniazid but resistant to rifampicin.

Conclusion: These findings suggest usefulness of different methodologies for detecting mycobacterial infections in HIV-Infected patients in order to establish strategies for rapid diagnosis and treatment of TB in this population.

P138

A POST IMPLEMENTATION REVIEW OF THE CEPHEID XPRT MTB RIF ASSAY VERSION G4 FOR THE DIAGNOSIS OF PULMONARY AND EXTRA-PULMONARY TUBERCULOSIS IN A LARGE ACUTE TERTIARY CARE INSTITUTE

Azhar Hamdan¹, Justine Woei Ling Peh¹, Yen Ee Tan¹, Li-Hwei Sng¹

¹Singapore General Hospital

Tuberculosis (TB) is a major health problem worldwide and its incidence is 36.7 per 100,000 in Singapore. Local cases of drug-resistant TB have also been increasing; thus quick and accurate diagnosis is essential for controlling its spread. An initial validation study using the Cepheid Xpert MTB/RIF Assay version G3 on 179 pulmonary and extra-pulmonary specimens had been performed from 2010-2011 at the Central Tuberculosis Laboratory. Subsequently, the laboratory evaluated and implemented the use of version G4 in 2012. A review was performed to assess the post-implementation test performance in the routine diagnostic laboratory.

All samples received between October 2012 and December 2014 were included in the study, with culture being used as the gold standard. Clinical case reviews were performed for discrepant cases. Of the 569 clinical samples, 546 had evaluable results. The sensitivity and specificity for pulmonary specimens was 89.3% (95% Confidence Interval [CI]: 78.5 – 95.0) and 90.5% (CI: 84.6 – 94.2); versus 68% (CI: 54.2 – 79.2) and 95.2% (CI: 92.1 – 97.1) for extra-pulmonary specimens. Compared to the earlier validation study, there was no significant difference in the test sensitivity ($p=0.78$ for pulmonary, $p=0.64$ for extra-pulmonary) and specificity ($p=1.0$ and $p=0.45$). The Xpert MTB/RIF was easily implemented for routine testing with minimal technical expertise required. However, the overall test performance was affected by the specimen type, prior antimicrobial treatment and equipment issues.

ANEXO 8. ABSTRACT DEL POSTER PRESENTADO EN EL 37th ANNUAL CONGRESS OF THE EUROPEAN SOCIETY OF MYCOBACTERIOLOGY, JULY 3-JULY 6, 2016 CATANIA-SICILY (ITALIA).

P 123

The Prevalence of Mycobacterial infections in HIV-infected patients from Bogota, Colombia

Martha I. Murcia¹, Magda Beltrán-León¹, Francy Johanna Pérez Llanos¹, Lilibiana Sánchez¹, Juan Germán Rodríguez¹, Carlos Parra-López¹, Myriam Navarrete¹, Ricardo Sánchez²

¹MICOBAC-UN Group, Department of Microbiology, National University of Colombia

²Department of Psychiatry, School of Medicine, National University of Colombia

Introduction: Concurrent infection with HIV and *Mycobacterium tuberculosis* (MTb) remains a serious global health problem (1). HIV infection not only increases the risk of reactivating latent MTb infection, it also increases the risk of tuberculosis (TB) and TB is one of the most common opportunistic infections in HIV patients. HIV-infection increases the risk of TB 20-fold compared with HIV-seronegative individuals in high HIV-prevalence countries. Tuberculosis is a

leading cause of death among HIV-infected patients, and diagnosis of TB remains challenging in HIV-infected individuals because of limited resources and atypical presentations. The aim of the study was to determine the prevalence of Mycobacterium species in HIV-infected patients in the era of Highly active antiretroviral therapy (HAART)

Methodology: The prevalence of mycobacterial infections was determined in a sample of 356 individuals infected with HIV, who were treated in the Simon Bolivar and Santa Clara Hospitals of Bogota, Colombia. A total of 1313 pulmonary and extrapulmonary clinical samples (mostly paired samples of blood, sputum, stool) were processed for acid-fast bacilli (AFB) stain, culture. PCR IS6110 and Genotype MTBDRplus 2.0. Resistance assays were applied at all *Mycobacterium tuberculosis* isolates using BACTEC-MGIT and Genotype MTBDRplus and they also were genotyped via Spoligotyping and 24 MIRU loci

Results: In total, 356 patients were studied, 289/356 (81.2%) were men and 18.8% women, the men: women ratio was 4.4:1. The age range was 18 to 72 years with a median of 36.5. Overall, 85/356 or (23.8%) were positive for mycobacteria by at least one of the diagnosis methods. *Mycobacterium tuberculosis* complex was identified in 69/356 (19.4%) patients, non tuberculous mycobacteria (NTM) were isolated in 15/356 (4.2%), the *Mycobacterium avium* complex was the predominant species and one patient presented coinfection by *M. tuberculosis* and *M. avium*. Using BACTEC-MGIT, 1/49 (2%) was resistant to rifampicine and 2/49 (4%) were resistant to isoniazid. Using Genotype MTBDRplus, 3/51 (5.9%) were resistant to rifampicine. Forty-nine isolates of *M. tuberculosis* were genotyped as being the most prevalent lineage Haarlem 55% (27/49), followed by the LAM lineage with 22% (11/49).

Conclusions: The general prevalence of mycobacteria in this study was 23.8% with the concurrent infection of HIV and *Mycobacterium tuberculosis* (MTb) of 19.4% which is higher than the 12% reported at the national level.

Keywords: HIV, Tuberculosis, NTM, Colombia