

TIPIFICACIÓN POR MINISATELITES DE AISLADOS CLINICOS DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EN UNA POBLACION EN CALI (COLOMBIA)

David Felipe García Méndez

Universidad del Valle, Apartado Aereo 25360, Cali, Colombia.

correo electrónico: david.garcia.mendez@gmail.com

Myriam Astudillo Hernández

Universidad del Valle, Apartado Aereo 25360, Cali, Colombia.

correo electrónico: myriam.astudillo@correounivalle.edu.co

RESUMEN

La tuberculosis (TB) continúa siendo uno de los problemas de salud pública más importantes globalmente. Con una incidencia de 55/100.000 habitantes en el 2012, Cali (Colombia) fue clasificada como una ciudad de alto riesgo en TB. Un total de 52 aislados de *M. tuberculosis* obtenidos de pacientes diagnosticados con TB pulmonar durante el periodo 2013 – 2014, residentes en Cali, fueron genotipificados por Análisis de unidades repetitivas intercaladas micobactecterianas – Número variable de repeticiones en tándem (MIRU-VNTR) de 24 loci. 50 perfiles MIRU-VNTR diferentes fueron encontrados con una distribución de los aislados por linajes de LAM 61,54 % (32/52), Haarlem 9,62 % (5/52), S 7,69 % (4/52), Cameroon 1,92 % (1/52), Beijing 1,92 % (1/52), H37Rv 1,92 % (1/52) al final, 11,35 % (8/52) de los aislados no fueron asignados a los linajes descritos. Los patrones MIRU-VNTR correspondieron a 20 MITs diferentes siendo los más frecuentes los MIT 190 (12/52) y MIT 45 (4/52). Análisis por dendograma y comparación con bases de datos permitieron demostrar observaciones previas del predominio de los linajes LAM y Haarlem en la ciudad y de la presencia de los MITs encontrados en otra ciudad de Colombia. Se encontraron también casos con posible transmisión reciente e infección policlonal. En conclusión, este trabajo permitió mostrar la distribución en linajes de aislados de *M. tuberculosis* en esta población y permitió demostrar la utilidad que puede tener la genotipificación por MIRU-VNTR como herramienta molecular que apoye estudios epidemiológicos en la ciudad y en Colombia que contribuyan al conocimiento de la TB en la región y contribuir a su control.

Palabras clave: MIRU-VNTR, linaje, población, tuberculosis.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) remains as one of the most important public health problems globally. With an incidence of 55/100.000 habitants in 2012, Cali (Valle del Cauca) was classified as a city of high risk for TB. A total of 52 *M. tuberculosis* isolates obtained from pulmonary TB diagnosed patients over the period 2013-2014 in Cali, were genotyped by 24 loci MIRU-VNTR. 50 different MIRU-VNTR profiles were found with a distribution of the isolates per lineages of LAM 61,54 % (32/52), Haarlem 9,62 % (5/52), S 7,69 % (4/52), Cameroon 1,92 % (1/52), Beijing 1,92 % (1/52), H37Rv 1,92 % (1/52) and only 11,35 % (8/52) of the isolates were not assigned to any of the described lineages. The MIRU-VNTR patterns corresponded to 20 different MITs being the most frequent the MIT 190 (12/52) and MIT 45 (4/52). Graphical analysis and comparisons with databases allowed demonstrate previous observations about the predominance of LAM and Haarlem lineages in the city and the presence of the MITs found in other city of Colombia. Also, possible recent transmission cases and policlonal infection were found. In conclusion, this work showed the distribution of lineage in *M. tuberculosis* isolates in this population and allowed to demonstrate the utility of the MIRU-VNTR genotyping technique as a molecular tool to support epidemiological studies in the city and in Colombia that contribute to the understanding of the dynamics of transmission of TB in the region and contribute to its control.

Key words: MIRU-VNTR, lineage, population, M. tuberculosis

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) continúa siendo uno de los problemas de salud más importantes globalmente. La TB se encuentra como la segunda causa de muerte por enfermedad infecciosa mundialmente, después del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). En el 2013 se informaron 9 millones de casos nuevos y 1.5 millones de muertes por TB (WHO 2014). La creciente Resistencia a Múltiples medicamentos (MDR) incluida resistencia extendida (XDR) en algunos países, la relación existente entre escenarios con precarias condiciones de vida y de trabajo en la población y la presencia del VIH, entre otros factores, han hecho difícil el control efectivo de esta enfermedad (Pedraza *et al.* 2012). La amenaza mundial de la TB ha incentivado entonces un esfuerzo global en la búsqueda de métodos de vigilancia epidemiológica eficaces de la enfermedad, que permitan el control y la disminución de su incidencia, el diagnóstico oportuno y el tratamiento adecuado de los casos ya reportados.

En Colombia, la OMS reportó en el 2013 una incidencia de 32 por 100.000 habitantes, manteniendo estas altas tasas de incidencia durante los últimos 10 años. Entre los departamentos del país existen brechas, encontrándose territorios que duplican el promedio nacional, reflejando diferencias en las medidas de control, de vigilancia al igual que diferencias en la dinámica de transmisión. El Valle del Cauca es uno de los departamentos con más casos informados. En el 2014 se informaron según el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) más de 1500 casos, con una incidencia de 33,7 en 100.000 habitantes. Cali, se clasifica como una ciudad de alto riesgo en TB, debido a que la incidencia de esta enfermedad es dos veces mayor a la de Colombia, para la cual en el 2012 se estimó una incidencia de 55 por 100.000 habitantes, con una tendencia creciente y presentando un complejo panorama para su control como lo es un alto porcentaje de abandono del tratamiento (15 %) y casos de coinfección TB/VIH entre el 11 y 13 % (SSPM 2013).

En este contexto, la tipificación molecular de los aislados de *Mycobacterium tuberculosis* ha ganado una creciente aceptación como una herramienta útil que facilita el entendimiento de la epidemiología de la TB (Mathema *et al.* 2006) y su prevención y control. La información brindada por estos análisis ha contribuido al conocimiento de la dinámica de transmisión y patogénesis de la enfermedad (Kato-Maeda & Small 2000; van Soolingen *et al.* 2002; Chaoui *et al.* 2014), permitiendo establecer la extensión y los factores de

riesgo probables de la transmisión reciente en una población, identificar la transmisión insospechada tempranamente, detectar la transmisión de cepas resistentes a los medicamentos, confirmar contaminación cruzada en el laboratorio, identificar cultivos falsos-positivos y distinguir entre casos de reinfección exógena o recaídas. (Cowan *et al.* 2002, citado en Pitondo *et al.* 2013; Barnes & Cave 2003).

Se han desarrollado numerosos métodos para la genotipificación de cepas de *M. tuberculosis* y describir su estructura poblacional. Hasta hace poco la técnica desarrollada por Van Embden (1993) basada en el análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y de la detección de la variabilidad en la presencia y posición de la secuencia de inserción IS6110 (RFLP – IS6110), era la técnica estándar para la tipificación de micobacterias (Rozo & Ribón 2010). Sin embargo, su alto consumo de tiempo y laboriosidad, impulsaron el desarrollo de técnicas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que han suplido estos problemas, aunque esta técnica sigue utilizándose en casos particulares (Cowan *et al.* 2005).

La técnica de espoligotipado basado en PCR del locus DR (del inglés Direct Repeat) (Kamerbeek *et al.* 1997) así como el Análisis de las Unidades Repetitivas Micobacterianas Interespaciadas - Número Variable de Repeticiones en Tándem (MIRU-VNTR) (Supply *et al.* 2006) han reemplazado actualmente el estándar RFLP – IS6110 por su menor complejidad técnica, fácil comparación de resultados, así como la disponibilidad de bases de datos internacionales que permiten realizar comparaciones con colecciones de aislados de diferente origen geográfico, el intercambio de información, la visualización de la distribución global de los linajes genotípicos de complejo *Mycobacterium tuberculosis* y el monitoreo de la dispersión de aislados de alto riesgo (por su capacidad de virulencia y resistencia a los tratamientos convencionales) incluyendo una información siempre creciente de múltiples marcadores genéticos (Allix-Beguec *et al.* 2008; Demay *et al.* 2012) y herramientas computacionales (Shabeer *et al.* 2012) para su análisis, generando una red para el estudio global de la epidemiología de la TB y permitiendo un acercamiento a la exploración de los aspectos evolutivos del *M. tuberculosis* (García de Viedma *et al.* 2011 citado por Demay *et al.* 2012)

En este estudio, se utilizó la genotipificación por MIRU-VNTR con el propósito de tipificar 52 ais-

lados clínicos de *M. tuberculosis* obtenidos de una población de pacientes residentes en Cali diagnosticados con TB pulmonar, para describir los patrones genéticos que circulan en la población de estudio y compararlos con otros estudios en Cali, Colombia y el mundo. Este trabajo permitió mostrar la distribución en linajes de aislados de *M. tuberculosis* en esta población y permitió demostrar la utilidad que puede tener la genotipificación por MIRU-VNTR como herramienta molecular que apoye estudios epidemiológicos estructurados en la ciudad y aún más allá en Colombia que contribuyan al conocimiento de la dinámica de transmisión de la TB en la región y permitir así su control y prevención.

MÉTODOS

Aspectos éticos

El estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Revisión de Ética Humana (CIREH) de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle y por la autoridad en salud local. Los participantes del estudio firmaron un consentimiento informado. Todos los datos y consentimientos firmados fueron conservados en físico y guardados en custodia del investigador principal para mantener la anonimidad de los pacientes.

Población de estudio

Durante el periodo 2013 – 2014 fueron captados 52 pacientes procedentes de diferentes Instituciones Prestadoras de Salud (IPS) de la ciudad de Santiago de Cali, que con diagnóstico de TB pulmonar, ingresaron para tratamiento. A dichos pacientes se les tomó una muestra de esputo antes de iniciar tratamiento antibiótico.

A cada muestra se le realizó baciloscopia mediante tinción de Zielh – Nielsen confirmando la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), además de una descontaminación con NaOH y N-acetil-cisteína (Kent & Kubica 1985) para ser cultivadas en Agar Lowenstein Jensen (LJ) y Agar Ogawa a 37°C hasta conseguir crecimiento durante máximo 12 semanas, para confirmar el diagnóstico en el laboratorio de tuberculosis del departamento de microbiología de la Universidad del Valle. Una unidad formadora de colonia (UFC) por paciente fue usado para la genotipificación.

Caracterización socio-demográfica y epidemiológica

Como parte del estudio se recolectaron los siguientes datos socio-demográficos y epidemiológicos encontrados en la Base de datos de los formatos

de registro del laboratorio de tuberculosis del departamento de Microbiología de la Universidad del Valle, Cali, con las variables de interés edad, género, lugar de residencia, ocupación, condición de ingreso (caso nuevo, recaída o reingreso), contacto previo con caso tuberculoso, pruebas de resistencia a fármacos antituberculosos, prueba VIH, factores de riesgo. Para asegurar la confidencialidad de los datos y para la protección de los pacientes, se utilizó un sistema de codificación numérica para la identificación de todos los pacientes – muestras.

Análisis moleculares

Extracción de ADN: El ADN de los aislados fue extraído utilizando el kit de extracción de la prueba Genotype MTBDRplus (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Alemania). Ensayos preliminares fueron realizados para comprobar la compatibilidad del ADN obtenido con la genotipificación (datos no mostrados). La evaluación de la calidad y cantidad del ADN obtenido, se realizó usando el equipo NanoDrop® (ThermoScientific, Estados Unidos).

Genotipificación MIRU-VNTR: Se siguió la metodología descrita por Supply *et al.* (2006) para un análisis por MIRU-VNTR de 24 loci. Las PCR se realizaron usando el kit HotStartTaq DNA polymerase (Qiagen, Hilden, Alemania). Brevemente, este método se basa en la amplificación por PCR de un set estándar de 24 loci, utilizando cebadores específicos para las regiones flanqueantes de cada locus de repetición y en la determinación de los tamaños de los amplicones, que reflejan los números de las copias específicas. Como control positivo y de calidad de las amplificaciones, se usó ADN de la cepa de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294).

Los amplicones obtenidos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (AGAROSE I™, Amresco, Estado Unidos) al 2 % a 110V por 1h. Los tamaños de los amplicones fueron estimados por comparación con marcadores de peso molecular de 50 (GeneRuler 50 pb DNA ladder, ThermoScientific, Estados Unidos) y 100 (GeneRuler 100 pb Plus DNA ladder, ThermoScientific, Estados Unidos) pares de bases (pb) y la asignación de los varios alelos VNTR fue realizado usando el software GelAnalyzer 2010 (Lazarsoftware, Estados Unidos)

Interpretación de resultados

Análisis de relación genética

Las relaciones genéticas entre los aislados fueron visualizadas por un dendograma obtenido por UPGMA (método de pares agrupados usando promedio aritmético) (Sneath & Sokal 1973) utilizando el coeficiente de distancia ca-

teórica, que fue realizado con las herramientas disponibles en el portal MIRU-VNTR plus (<http://www.miru-vntrplus.org>).

Análisis de la diversidad alélica de los MIRU – VNTR

La diversidad alélica (h) en un locus dado y la diversidad alélica media (H) se calcularon como $h = 1 - \sum x_i^2 [(\frac{n}{n-1})]$ y $H = \frac{1}{h} \sum h_i$ respectivamente, donde x_i es la frecuencia de alelo i -ésimo en el locus, h_i la diversidad alelica en el locus i y n el número de loci. Adicionalmente, se calculó el índice de discriminación de Hunter-Gaston (Hunter & Gaston 1988) como $D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1)$, donde N es el total de aislados en la muestra, S el número de genotipos descritos, y n_j es el número de aislados pertenecientes al tipo j , para establecer el poder de discriminación del método.

Comparación con bases de datos internacionales.

Los resultados obtenidos fueron comparados con los datos contenidos en las bases de datos del MIRU-VNTR plus (<http://www.miru-vntrplus.org>) para la clasificación basada en minisatélites (incluyendo los 24 loci MIRU analizados) de los aislados dentro de los diferentes linajes conocidos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) y también con los datos del SITVIT-

WEB (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/). Para este último se utilizó solamente un set de 12 loci MIRU que fueron descritos previamente por el autor (Demay *et al.* 2012).

RESULTADOS

Caracterización socio-demográfica

Los 52 pacientes que integraron la población estudiada presentaron una edad promedio de 40,3 años (Desviación estándar de 15,14) con un rango de 18 a 68 años, la mayoría de género masculino 65,38 % (34/52) y afiliados al régimen subsidiado de salud 71,15 % (37/52). Se encontraron varias ocupaciones, siendo las más frecuentes aquellas relacionadas con trabajo no calificado (NC) 30,77 % (16/52) y el área de servicio y vendedores (SV) 11,54 % (6/54). El 63,46 % (33/52) de los pacientes se clasificaron en la categoría “otros” (OT) sobre su etnia y el 15,38 % (8/52) en la población afrodescendiente (AF) (Tabla 1). Se incluyeron pacientes de la mayoría de comunas de Cali (con excepción de las comunas 21 y 22) teniendo por lo menos 1 paciente por comuna (Figura 1). Los resultados detallados incluyendo la información socio-demográfica de los pacientes se encuentran resumidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Caracterización socio-demográfica de la población de estudio.

		n	(%)			n	(%)
Género	Masculino	34	65,38	Régimen contributivo	Contributivo	9	17,30
	Femenino	18	34,62		Subsidiado	37	71,15
Ocupación	PU	1	1,92	Etnia	No afiliado	6	11,53
	TP	2	3,35		Afrocolombiano	8	15,38
	SV	6	11,54		Indígena	1	1,92
	AT	2	3,85		Mestizo	1	1,92
	OO	2	3,85		Otros	33	63,46
	OI	1	1,92		Romani	1	1,92
	NC	16	30,77		SD	8	15,38
	DP	6	11,54	Edad (años)	Mínimo	18	
	ES	2	3,85		Máximo	68	
	RE	3	5,77		Promedio	40,36	
	SD	11	21,15		DE	15,14	

*** Frecuencias absolutas (n). Categorías: Para la ocupación se tiene Profesionales Universitarios (PU). Técnicos, postsecundarios no universitarios y asistentes (TP). Trabajadores de los servicios y vendedores (SV). Agricultores, trabajadores y obreros agropecuarios, forestales y pesqueros (AT). Oficiales, operarios, artesanos y trabajadores de la industria manufacturera, de la construcción y de la minería (OO). Operadores de instalaciones, de máquinas y ensambladores (OI). Trabajadores no calificados (NC). Desempleado (DP). Estudiante (ES), Recluso (RE) y sin datos (SD). Categorías basadas en la Clasificación Internacional Uniforme de Ocupaciones Adaptada para Colombia (DANE) con algunas modificaciones.

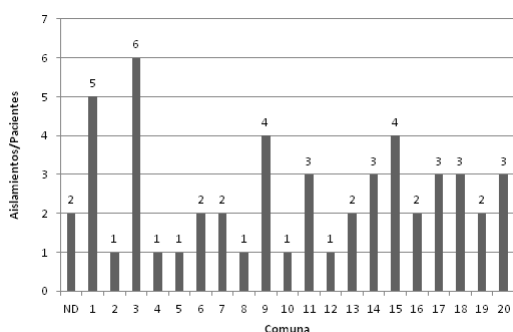


Figura 1. Distribución por comunas de la población de estudio. ND= pacientes sin dato.

Caracterización epidemiológica

El 71,15 % (37/52) de los casos fueron informados como nuevos y se encontró un 15,38 % (8/52) y 1,92 % (1/52) de recaídas y reingresos respectivamente. Coinfectados con VIH 1,92 % (1/52) de

los pacientes presentó seropositividad a la prueba de coinfección con VIH y 26,92 % (14/52) fueron informados como negativos. Sin embargo, 71,15 % (37/52) de los pacientes no tuvieron reporte sobre esta prueba. De los aislados (11,54 %) (6/52) tuvieron algún grado de resistencia, entre ellos tres resistentes al medicamento Isoniazida, uno a rifampicina y dos aislados MDR (resistentes a ambos medicamentos). Se encontraron seis casos con conocimiento de contacto previo con personas infectadas con tuberculosis. El 29,62 % (22/52) de los pacientes presentaron alguna condición de riesgo asociada a la infección con tuberculosis entre las que se incluye diabetes 11,11 % (6/52), farmacodependencia 7,69 % (4/52) y desnutrición 1,92 % (1/52).

Los resultados detallados incluyendo la información epidemiológica se encuentran resumidos en la Tabla 2.

Tabla 2. Caracterización epidemiológica de la población de estudio.

		n	(%)			n	(%)
Condición de ingreso	N	37	71,15	Factores de riesgo	Leuc	1	1,92
	R	8	15,38		Farmacod	4	7,69
	RI	1	1,92		Diabetes	6	11,11
	ND	6	11,53		Desnutrición	1	1,92
Prueba VIH	P	1	1,92	Sensibilidad a antibióticos	Enf. pulmonar	1	1,92
	N	14	26,92		Desnut y farmacod	3	5,56
	ND	37	71,15		MR	4	7,69
Contacto previo	Si	6	11,54		MDR	2	3,85
	No	23	44,23		S	46	88,46
	ND	23	44,23				

*** Frecuencias absolutas (n). Categorías: Condición de ingreso nuevo: (N), recaída (R), reingreso (RI). Prueba de VIH: positiva (P), Negativa (N), No dato. Suceptibilidad a antibióticos: Monorresistencia (MR), muldrogorresistencia (MDR), Sensible (S). Los factores de riesgo encontrados fueron Leucemia (Leuc),Farmacodependencia (Farmacod), Diabetes, Desnutrición, Enfermedad pulmonar (Enf. pulmonar), Desnutrición y farmacodependencia (Desnut y farmacod).

Análisis moleculares

Se genotipificaron mediante el análisis de MIRU-VNTR todos los aislados estudiados (Tabla 3). Los aislados 20, 70, 90 presentaron alelos dobles en uno de sus locus mientras que para el aislado 90 se observaron 3 alelos en el locus MIRU 53 (figura 2). Por otro lado, el aislado 91 presentó alelos dobles en múltiples locus (MIRU 42, 40, 10, 47, 52, 53, ETR-A, ETR-B) con lo cual se sospechó la posible presencia de una infección policlonal en este paciente.

Los loci con la mayor diversidad alélica (0,73) fueron el MIRU 40, QU11b y QUB26 siendo los más discriminatorios. En estos locus se observó la mayor cantidad de alelos diferentes. En cambio

los locus MIRU 20, MIRU 39, MIRU 46 y MIRU 24 presentaron las menores diversidades alélicas (entre 0,00 y 0,02). Estos dos últimos locus fueron monomórficos ya que solo presentaron un alelo que fue común en todos los aislados (Tabla 4). Con los datos se obtuvo entonces una diversidad alélica media (H) de 0,417.

Análisis de relación genética

El poder discriminatorio del método establecido por HGDI fue 0,9977. En la figura 2 se observa el dendograma obtenido por UPGMA de los aislados estudiados con sus perfiles MIRU. En

Tabla 3. Perfil MIRU VNTR para los 52 aislados de *M. tuberculosis* obtenidos de pacientes con TB pulmonar en Cali.

AISLADO	Perfil MIRU	AISLADO	Perfil MIRU
1	134203332224126153322622	40	234332322344225153334522
4	124204332124126153222222	41	223235332524425153333742
7	134204332214126153322622	56	222235332424435153234942
8	114204332224116153322622	62	223235322534435153233732
9	213235232434435153234732	63	23434332224225153334822
10	21424323163422515333(10)622	65	134204332404136153222622
11	244212132224116152332602	66	134204332404136153222622
12	134204332224126153322622	67	122234332224126153323622
13	213245322534435153233732	69	234223422424235153233522
14	134204232224126153222822	70	2432353324*4335143333752
16	134204332444126143522622	75	223224342734425143333632
17	134204332224126153222622	82	244214232324116151532232
19	223235332534426153334742	86	224342312444225153334622
20	1322323322*4126153322522	90	134204332434146153222*2
21	223234332424435153234742	91	2*32**3325*4**515313*5*2
22	234212132424146142132822	92	222233332334425153233442
24	213233332534435153233532	96	134204332424126153222622
25	222233232534425153343742	106	232234232924226153131922
26	234214232324116153432632	114	222234232424226153331622
28	232233232424226153131722	119	232242322534*25153335622
29	234342322244225153334222	120	134204332224126153322222
30	134203332224126153323622	123	244244322424216133231622
34	223235332434435153233742	124	244214232414156153132232
36	224213352944425163342823	142	124204332224126153322822
37	124204232224126133322622	145	1342053324(1s)4136133222622
39	244213231424126183332422	150	134204332404136153222622

Los loci MIRU rellenos con (*) son aquellos en los cuales se presentaron múltiples alelos. Los resultados para el aislado 91 fueron no interpretables por la presencia de múltiples alelos en varios loci. Los alelos marcados con (s) corresponden a variantes alélicas que no poseen suficientes repeticiones en dicho locus.

total se obtuvieron 50 perfiles diferentes para los 52 aislados dado que como se puede observar los aislados 150, 65 y 66, provenientes de pacientes diferentes presentaron el mismo perfil MIRU lo cual demuestra el alto nivel de discriminación de la técnica (Figura 3). Los aislados 11 y 12 fueron agrupados con una única diferencia por sus alelos en el MIRU 10. Lo mismo se presentó para los aislados 17 y 96 que tuvieron alelos diferentes en el MIRU QUB-11b. Por otro lado, dado que se obtuvieron múltiples alelos en diferentes loci para el aislado 91, este resultado se consideró no interpretable. Subsecuentemente, este aislado se encontró como el más distante en el dendograma. Conociendo las limitaciones generadas por el tamaño poblacional, se decidió en este punto no realizar un análisis por clusters (agrupaciones definidas en el dendograma) para contrastar con las variables socio-demográficas obtenidas, pues los resultados podrían estar determinando relaciones

que puedan no ser ciertas en la población general en la ciudad.

Comparación con las bases de datos internacionales

Al contrastar los resultados obtenidos con la base de datos MIRU-VNTRplus se realizó la clasificación por linaje filogenético de los aislados estudiados. Primero se realizó un análisis por mejor coincidencia (Best Match) con un punto de corte de distancia por defecto (0,17), el cual presenta una tolerancia de máximo una diferencia de 4 locus entre los aislados comparados. Se encontró que el 57,69 % de los aislados fueron asignados a un linaje desconocido, 28,85 % fueron identificados dentro de linaje LAM, 9,62 % dentro del linaje Haarlem y por último 3,85 % fueron asignados al linaje S. Para clasificar aquellos aislados que fueron asignados como desconocidos se realizó posteriormente un análisis basado en el árbol filogenético de las cepas de referencia (Tabla

5).

Tabla 4. Diversidad alélica de los MIRU VNTR en 56 aislados de *M. tuberculosis* obtenidos de pacientes con TB pulmonar en Cali.

LOCUS	AD	(h)	LOCUS	(h)	AD
MIRU 02	2	0,46	VNTR 47	0,64	4
VNTR 42	4	0,66	VNTR 48	0,59	5
VNTR 43	3	0,54	MIRU 23	0,47	2
MIRU 04	1	0,13	MIRU 24	0,00	1
MIRU 40	5	0,73	MIRU 26	0,29	5
MIRU 10	4	0,69	MIRU 27	0,09	3
MIRU 16	4	0,43	VNTR 49	0,62	5
1955	4	0,34	MIRU 31	0,51	3
MIRU 20	2	0,06	VNTR 52	0,68	6
QUB11b	8	0,73	QUB26	0,73	7
ETRA	5	0,68	MIRU 53	0,55	5
MIRU 46	1	0,00	MIRU 39	0,02	2

*** Alelos diferentes (AD) y diversidad alélica (h)

Con este nuevo análisis se redujo la cantidad de aislados con linaje desconocido a 8 aislados (15,38 %) para los cuales no hubo semejanza con ninguna de las cepas de referencia por mejor coincidencia dentro del punto de corte y el análisis de su ubicación dentro del árbol resultó ser ambigua. Con esta nueva clasificación finalmente se obtuvo una distribución en los linajes de LAM 61,54 % (32/52), Haarlem 9,62 % (5/52), S 7,69 % (4/52), Cameroon 1,92 % (1/52), Beijing 1,92 % (1/52), H37Rv 1,92 % (1/52) al final, al 11,35 % (8/52) de los aislados no pudieron ser asignados a ninguno de los linajes descritos.

Adicionalmente, se contrastaron los resultados contra la base de datos SITVITWEB que tiene en cuenta un análisis por MIRU-VNTR pero en su versión de 12 loci, una vez filtrados los loci adecuados, se encontró que 16 aislados (30,77 %) presentaron patrones huérfanos que no tuvieron semejanza con ninguna de los aislados de *M. tuberculosis* reportadas (Tabla 5). Los aislados estuvieron representados por 20 MITs (Miru International Types) diferentes, que son asignados cuando por lo menos dos aislados coinciden en sus perfiles formando un nuevo grupo. Entre ellos los más frecuentes fueron el MIT 190 con 12 aislados 23,08 % (12/52) y el MIT 45 con 4 aislados 7,69 % (4/52). Los demás aislados se distribuyeron unifor-

memente entre los otros MIT encontrados (Tabla 5).

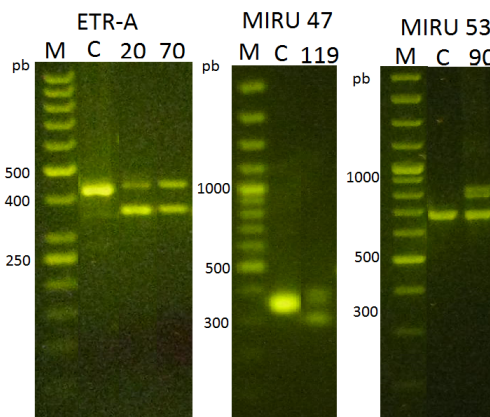


Figura 2. Locus MIRU con múltiples alelos. Con letras se representa el marcado de peso de molecular (M), el control positivo de la prueba con la cepa H37Rv (C) y con números la identificación de los aislados. En el locus ETR-A se observaron dobles alelos en los aislados 20 y 70. En el locus MIRU 47 para el aislados 119 y por último se encontró la presencia de tres alelos el locus MIRU 53 para el aislado 90.

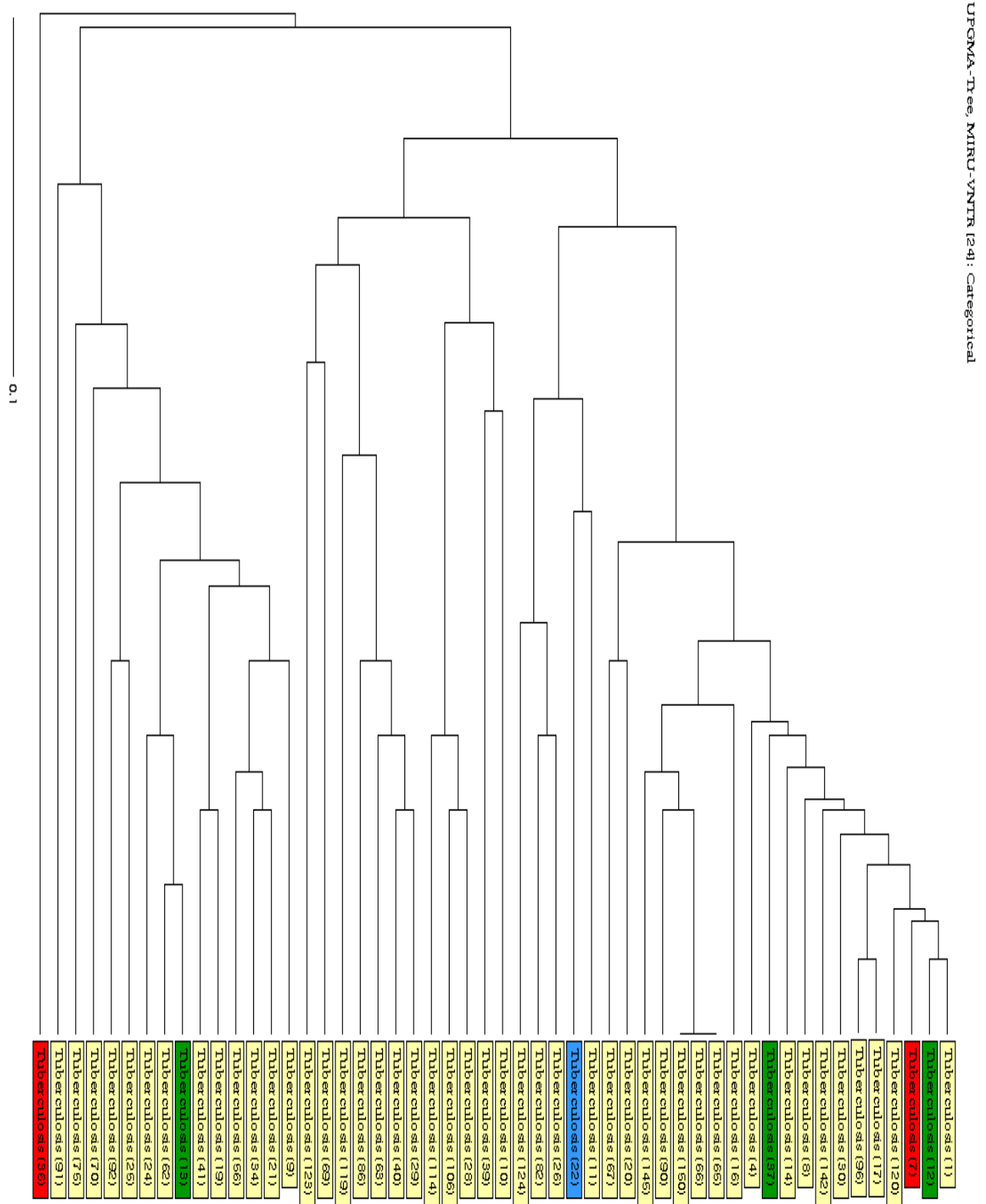


Figura 3. Dendrograma obtenido por UPGMA de los aislados de *M. tuberculosis* en la población de estudio. Se incluyen los perfiles MIRU-VNTR de cada aislado. En verde y azul se resaltan los aislados que presentaron monoresistencia (MR) a Isoniazida (INH) y Rifampicina (INH) respectivamente, mientras que en rojo se resaltaron los aislados multidrogoresistentes (MDR) que presentaron resistencia a RMP e INH. Los espacios rellenos con el símbolo (*) representa aquellos loci para los que se encontraron alelos dobles o múltiples.

Tabla 5. Distribución por linajes y MIT de los aislados de *M. tuberculosis* en la población estudiada

AISLADO	LINAJE	MIT	AISLADO	LINAJE	MIT
1	LAM(*)	—	40	S(**)	109
4	LAM(**)	190	41	Haarlem(*)	45
7	LAM(*)	190	56	ND	45
8	LAM(*)	190	62	ND	45
9	ND	188 ^a	63	S(*)	212
10	Cameroon(**)	263 ^a	65	LAM(**)	190
11	LAM(**)	432	66	LAM(**)	190
12	LAM(*)	190	67	LAM(*)	—
13	ND	46	69	H37Rv	157 ^a
14	LAM(**)	—	70	ND	611
16	LAM(**)	—	75	Haarlem(*)	150 ^a
17	LAM(*)	190	82	LAM	—
19	Haarlem(*)	247	86	S(**)	—
20	LAM(*)	—	90	LAM(**)	190
21	ND	33 ^a	91+	—	—
22	LAM(**)	—	92	ND	116
24	Haarlem(*)	116	96	LAM(*)	190
25	ND	—	106	LAM(*)	242 ^a
26	LAM(**)	25	114	LAM(*)	242 ^a
28	LAM(*)	753 ^a	119	LAM(**)	146 ^a
29	S(*)	—	120	LAM(*)	190
30	LAM(*)	—	123	LAM(**)	313 ^a
34	Haarlem(*)	45	124	LAM(**)	25
36	Beijing(**)	—	142	LAM(*)	190
37	LAM(**)	—	145	LAM(**)	—
39	LAM(**)	—	150	LAM(**)	190

(*)Linaje designado por análisis de mejor coincidencia (Best match) (**) Linaje designado por análisis basado en árbol filogenético. + Múltiples alelos detectados en varios loci hicieron que los resultados para este aislados fueran no interpretables.^(a) MITs no reportados en otros estudios.

DISCUSIÓN

Este estudio a pesar de contar con 52 casos que se encontraron dispersos por la zona urbana de Cali, es claro que no constituye una muestra representativa de la diversidad genética asociada a la circulación del *M. tuberculosis* entre los pacientes diagnosticados con TB pulmonar en la ciudad. Sin embargo, constituye un aporte al trabajo de vigilancia y monitoreo de la transmisión reciente de aislados entre la población, la identificación de casos de transmisión insospechada tempranamente y de cepas resistentes a los medicamentos.

En la población estudiada no se encontró una frecuencia alta de transmisión reciente, interpretada como grupos de pacientes cuyos aislados coincidieran en sus perfiles genéticos y que además pudiesen ser vinculados epidemiológicamente, lo cual se corrobora con el alto poder de discriminación encontrado por el HGDI del método. Por el contrario, un alto número de genotipos (50 perfiles diferentes) se observó asociada a la circulación

de estos aislados en esta población y sólo los aislados de tres pacientes fueron agrupados en los análisis. Al consultar los datos de estos pacientes se encontró que no tenían ningún vínculo epidemiológico y que además residían en diferentes comunas de la ciudad. Sin embargo, este hallazgo resalta la importancia del desarrollo de estudios estructurados desde el punto de vista epidemiológico, que estén sustentados en herramientas moleculares como la técnica usada en este estudio, para lograr abarcar un mayor tamaño poblacional y enfocados no solo a la caracterización genética de los aislados, sino a la detección de posibles casos de transmisión reciente insospechados tempranamente permitiendo trazar las posibles cadenas de transmisión y así contribuir a los análisis de la dinámica de transmisión de la TB pulmonar en la ciudad. Por ejemplo, el estudio realizado por Rodríguez *et al.* (2008) muestra la eficiencia que tiene la genotipificación por MIRU-VNTR para diferenciar los casos de aquellos pacientes que no están relacionados epidemiológicamente y su

utilidad en estudios poblacionales para una rápida identificación de los aislados. El no encontrar un mayor número de casos agrupados, puede ser un efecto del tamaño muestral estudiado y de la poca representatividad del número de aislados colectados desde el punto de vista espacial, esto es, que en muchas de las comunas incluidas en los casos sólo se obtuvo 1 o 2 aislados.

Respecto a la diversidad alélica en cada locus, en este estudio los loci MIRU 40, QU11b y QUB26 fueron los que presentaron la mayor diversidad alélica y por ende mayor discriminación en tanto los loci MIRU 20, MIRU 39, MIRU 46 y MIRU 24 fueron los menos diversos. Estos resultados coinciden con lo encontrado en estudios previos realizados en Bogotá y diferentes regiones de Colombia incluyendo Cali (Cerezo *et al.* 2012, Realpe *et al.* 2014). Lo cual plantearía la posibilidad de escoger un set estándar con un menor número de loci para la tipificación de aislados en estudios posteriores que alcancen un poder de discriminación cercano al obtenido por la técnica en su versión de 24 loci.

En el análisis de clasificación por linaje de los aislados, se encontró un predominio del linaje LAM seguido de Haarlem y S, con la presencia de otros menos frecuentes como Cameroon, Beijing y un aislado cercano a la cepa de referencia H37Rv. Esta tendencia se ha observado en otros estudios. En un estudio realizado por Realpe *et al.* (2014) el linaje LAM y Haarlem representaron el 39,1 % y 39,0 % de los aislados estudiados de Cali respectivamente. El linaje Haarlem no se presentó con tanta frecuencia en este estudio, pero sí se observó el predominio descrito del linaje LAM. Pero a comparación de este estudio, uno de los aislados estudiados tuvo un perfil relacionado con el linaje Beijing que estuvo ausente en la anterior investigación. Esta observación, estaría apoyada por el hecho de que este aislado fue informado como MDR y este linaje ha sido asociado con patrones de multirresistencia en múltiples estudios (Park *et al.* 2005; Parwati *et al.* 2010; de Steenwinkel *et al.* 2012; De Beer *et al.* 2014 citado por Panaiotov *et al.* 2014;). No obstante, otros estudios han informado con muy poca frecuencia la presencia de aislados de *M. tuberculosis* pertenecientes a este linaje obtenidos de pacientes con origen geográfico diferente a Buenaventura (ciudad portuaria ubicada a cercanías de Cali) en que se ha informado previamente la presencia de este linaje (Nieto *et al.* 2012). Sin embargo, como se mencionó anteriormente un análisis con un segundo marcador y una evaluación más detenida del perfil de resistencia a otros fármacos de este aislado podrían lograr una mejor determinación

de la validez de esta observación.

Los aislados que se encontraron relacionados con linajes como Cameroon y la cepa H37Rv, resultan ser atípicos, para este primero no hay estudios que reporten su presencia en Colombia y se encuentra asociado a poblaciones africanas (Wirth *et al.* 2008) y segundo un perfil cercano a la cepa control podría significar un posible caso de contaminación de la muestra de dicho paciente en el laboratorio o durante el desarrollo de la tipificación.

Para 8 de los aislados no fue posible determinar su linaje al contrastar su perfil con la base de datos MIRU-VNTRplus al obtener resultados ambiguos y otros 16 (entre los que se incluye 1 aislado de la situación anterior) presentaron patrones huérfanos al contrastar con la base del SITVITWEB. Con lo cual se aportan nuevos perfiles genéticos basados en MIRU-VNTR para el establecimiento la estructura poblacional del *M. tuberculosis* en la ciudad. Estos patrones huérfanos fueron comparados con los resultados de patrones huérfanos obtenidos por Realpe *et al.* (2008) (datos no mostrados) y no se encontraron semejanzas. Sin embargo, la tipificación con un segundo o tercer marcador como el spoligotyping o el RFLP-IS610, puede ser útil para superar las ambigüedades presentadas en la clasificación y además confirmar los hallazgos encontrados con único marcador, análisis conjunto que se ha realizado en varias investigaciones globalmente (Barletta *et al.* 2013; Lu *et al.* 2014).

La comparación con la base de datos del SITVITWEB mostró también la dispersión de los aislados dentro de diferentes grupos MITs, siendo los más frecuentes el MIT 190 y 45. Estos MIT han sido encontrados en Bogotá como de alta frecuencia (Cerezo *et al.* 2012). Sin embargo, hay un grupo de MITs que no han sido encontrados en otras ciudades (Tabla 5). Lo cual demuestra las posibles diferencias en la distribución de diferentes genotipos entre las ciudades de Colombia. Lo anterior, estaría apoyado en las brechas que existen en las medidas de control y de vigilancia en el país que influyen la dinámica de transmisión de la TB. Dichas diferencias han sido hasta hace poco demostradas, encontrándose agrupaciones específicas de ciertos linajes en ciudades y poblaciones con ciertas configuraciones demográficas y espaciales, el Cauca por ejemplo mostró en un estudio, diferencias en la distribución de los linajes comparado con Cali y Medellín, lo que sugirió que de hecho se pueden presentar diferencias en las condiciones de transmisión y de factores en el huésped que afectan el establecimiento de un cierto linaje en la población (Realpe *et al.* 2014). Sin contar el gran aporte que han realizado estos estudios, aún quedan muchos vacíos para establecer realmente

cuál es la distribución de esos linajes en Colombia, en sus diferentes departamentos y consecuentemente, cómo es la dinámica de transmisión en el país. Como se mencionó anteriormente las brechas existentes entre departamentos constituyen un mosaico de escenarios en los que se pueden encontrar diferencias en la distribución y asociación de diferentes poblaciones de *M. tuberculosis* entre sus habitantes.

En conclusión, este trabajo permitió mostrar la distribución en linajes de aislados de *M. tuberculosis* en una población de pacientes diagnosticados con TB pulmonar residentes en la ciudad de Cali, demostrándose el predominio del linaje LAM y Haarlem dentro de la población, lo cual apoyaría las observaciones encontradas en estudios previos. La genotipificación por MIRU-VNTR permitió la identificación de una gran variedad de genotipos circulando en la población y también, casos con una posible transmisión reciente, casos con infección policlonal y mostró su utilidad como herramienta molecular que apoye estudios epidemiológicos estructurados en la ciudad y aún más allá en Colombia. Estudios posteriores que incluyan un mayor tamaño muestral en conjunto

con otros análisis, podrían dilucidar las posibles asociaciones existentes entre la distribución encontrada de los linajes y aspectos específicos de la relación patógeno-hospedero en la ciudad que hayan podido condicionar el predominio estos linajes en la población.

AGRADECIMIENTOS

A la sección de Bacteriología del Departamento de Microbiología de la Universidad del Valle por el financiamiento y préstamo de sus instalaciones para el desarrollo del presente estudio. A todo su personal y docentes. A Myriam Astudillo, Leonor Oviedo, Graciela Barona y Amparo Benavides por su acompañamiento, asesoría y apoyo. A la Dra. Beatriz Parra y al laboratorio de Virología por los materiales y equipos prestados. Finalmente, a mi familia, a mi novia Ma. Juliana y colegas Daniel Vásquez, Vanessa Ávila, Julieth Murillo, Javier Bustamante por su apoyo, acompañamiento y ayuda en la compilación del documento.

LITERATURA CITADA

- Allix-Beguec, C., Harmsen, D., Weniger, T., Supply, P., Niemann, S. (2008), "Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 46, No. 8, pp. 2692-99
- Barletta, F., Otero, L., Collante, J., Asto, B., de Jong, B., Seas, C. and Rigouts, L. (2013), "Genetic variability of *Mycobacterium tuberculosis* complex in patients with no known risk factors for MDR-TB in the North-Eastern of Lima, Peru", *BMC infectious disease*, Vol. 13, No. 397, Available at: www.biomedcentral.com/1471-2334/13/397
- Barnes, P. F., and M. D. Cave. (2003), "Molecular epidemiology of tuberculosis", *N. Engl. J. Med.* Vol. 349, pp. 1149-56.
- Cerezo, I., Jimenez, Y., Hernandez, J., Zozio, T., Murcia, M.I. and Rastogi N. A. (2012), "First insight on the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* complex as studied by spoligotyping and MIRU-VNTRs in Bogota, Colombia", *Infection Genetics and Evolution*, Vol. 12 No. 4, pp. 657-63.
- Chaoui, I., Zozio, T., Lahlou, O., Sabouni, R., Abid, M., El Aouad, R., Akrim, M., Amzazi, S., Rastogi, N. and El Mzibri, M. (2014), "Contribution of spoligotyping and MIRU-VNTRs to characterize prevalent *Mycobacterium tuberculosis* genotypes infecting tuberculosis patients in Morocco", *Infection Genetics and Evolution*, Vol. 21, No. 1, pp. 463-471.
- Cowan, L. S., Diem L., Monson T., Wand P., Temporado D., Oemig T. V. and Crawford J. T. 2005, "Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States", *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 43, pp. 688-95.
- Cowan, L.S., Mosher, L., Diem, L., Massey, J.P. and Crawford, J.T. (2002), "Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units", *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 40, pp. 1592-602.
- De Beer J., Ködmön, C., van der Werf, M., van Ingen, J. and van Soolingen D. (2014), "The ECDC MDR-TB molecular surveillance project participants. Molecular surveillance of multi- and extensively drug-resistant tuberculosis transmission in the European Union from 2003 to 2011", *Euro Surveill*, Vol. 19, No. 11, pp. 1-9

- De Steenwinkel, M., ten Kate, T., de Knecht, J., Kremer, K., Aarnoutse, E., Boeree, J., Verbrugh, H., van Soolingen, D. and Bakker-Woudenberg, M. (2012), "Drug Susceptibility of Mycobacterium tuberculosis Beijing Genotype and Association with MDR TB", *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 18, No. 4, pp. 660–63
- Demay, C., Liens, B., Burguière, T., Hill, V., Couvin, D., Millet, J., Mokrousov, I., Sola, C., Zozio, T. and Rastogi, N. (2012), "SITVITWEB – A publicly available international multimarker database for studying Mycobacterium tuberculosis genetic diversity and molecular epidemiology", *Infection, Genetics and Evolution*, Vol.12, No. 4, pp. 755–66
- García de Viedma, D., Mokrousov, I., Rastogi, N. (2011), "Innovations in the molecular epidemiology of tuberculosis", *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, Vol. 29, Suppl. 1, pp. 8–13
- Hunter, P.R and Gaston, M.A. (1988), "Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity", *J Clin Microbiol*, Vol. 26, pp. 2465–66.
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M. and van Soolingen D. (1997), "Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology", *J Clin Microbiol*, Vol. 35, pp. 907–14
- Kato-Maeda, M. and Small, P.M. (2000), "How molecular epidemiology has changed what we know about tuberculosis", *West Journal of Medicine*, Vol.172, pp. 256–59.
- Kent B, Kubica G (1985), *Public Health Mycobacteriology. A guide for the level III laboratory*. Atlanta, GA: Center for Disease Control (CDC).
- Lu, W., Lu, B., Liu, Q., Dong, H., Shao, Y., Jiang, Y., Song, H., Chen, C., Li, G., Xu, W., Zhao, X., Wan, K. and Zhu, L. (2014), "Genotypes of Mycobacterium tuberculosis isolates in rural China: Using MIRU-VNTR and Spoligotyping methods", *Scand J Infect Dis*, Vol. 26, No. 2, pp. 98–106
- Mathema, B., Kurepina, N., Bifani, P. and Kreiswirth, B. (2006), *Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights*. *Clin Microbiol Rev*, Vol. 19, pp. 658–85.
- Nieto, L., Ferro, B., Villegas, S., Mehaffy, C., Forero, L., Moreira, C., Rastogi, N. and van Soolingen, D. (2012), "Characterization of extensively drug-resistant tuberculosis cases from Valle del Cauca, Colombia", *J Clin Microbiol*, Vol 50, pp 4185–87.
- Panaiotov, S., Bachiyska, E., Yordanova, S., Atanasova, Y., Brankova, N., Levterova, V., Sengstake, S., Anthony, R., Bergval, I., Sola, C. and Kantardjiev, T. (2014), "Beijing Lineage of MDR Mycobacterium tuberculosis in Bulgaria, 2007–2011", *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 20, No. 11, pp. 1899–901
- Park, Y., Shin, S., Ryu, S., Cho, S., Koh, W., Kwon, O., Shim, Y., Lew, W., Bai, G. (2005), "Comparison of drug resistance genotypes between Beijing and non-Beijing family strains of Mycobacterium tuberculosis in Korea", *J Microbiol Methods*, Vol. 63, pp. 165–72
- Parwati, I., van Crevel, R. and van Soolingen, D. (2010), "Possible underlying mechanisms successful emergence of the Mycobacterium tuberculosis Beijing strains", *The lancet infectious disease*, Vol. 10, No. 2, pp 103–11
- Pedraza, L.M., Garcia, C., and Muñoz, A. (2012), "Caracterización de pacientes con tuberculosis y tuberculosis resistente a múltiples medicamentos en instituciones de tercer nivel de Bogotá D.C.", *Enfermería Global*, Vol. 25, pp. 129–38
- Pitondo-Silva, A., Santos, A.C., Jolley, K.A., Leite, C.Q. and Darini, A.L. (2013), "Comparison of three molecular typing methods to assess genetic diversity for Mycobacterium tuberculosis", *Journal of Microbiology Methods*, Vol. 93 No.1, pp. 42–8.
- Realpe, T., Correa, N., Roza, J. C., Ferro, B. E., Gomez, V., Zapata, E., Ribon, W., Puerto, G., Castro, C., Nieto, L., Diaz, M., Rivera, O., Couvin, D., Rastogi, N., Arbelaez, M. and Robledo, J. (2014), "Population Structure among Mycobacterium tuberculosis Isolates from Pulmonary Tuberculosis Patients in Colombia", *PLoS ONE*, Vol. 9, No. 4, pp. 1–12
- Rodriguez, N., Martinez, M., Herranz, M., Sanchez, M., Barroso, P., Bouza, E., and de Viedma D., (2008), "Evaluation of the new advanced 15-loci MIRU-VNTR genotyping tool in Mycobacterium tuberculosis epidemiology studies", *BMC Microbiology*, Vol. 8, No. 34, Available at: www.biomedcentral.com/1471-2180/8/34

- Rozo, J.C. and Ribon, W. (2010), "Molecular tools for Mycobacterium tuberculosis genotyping", *Revista Salud Publica*, Vol.12 No.3, pp. 510-21.
- Secretaría de Salud Pública Municipal de Santiago de Cali (2013), *Boletín epidemiológico 2012 y primer semestre 2013*. SSPM - Grupo de Salud Pública y epidemiología.
- Shabbeer, A., Ozcaglar, C., Yener, B., and Bennett, K. (2012), "Web tools for molecular epidemiology of tuberculosis", *Infection, Genetics and Evolution*, Vol. 12, No. 4, pp. 767-81
- Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (2014), *Boletín epidemiológico semanal: Semana epidemiológica número 52 de 2014 (21 dic. al 27 dic.)*. Instituto Nacional de Salud - Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública.
- Sneath, P.H. and Sokal, R.R. (1973), *Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification*, Freeman, San Francisco. CA.
- Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rüsch-Gerdes, S. and Willery, E. (2006), "Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis", *Journal of clinical microbiology*, Vol. 44 No.12, pp. 4498-510.
- Van Embden, J.D., Cave, M.D., Crawford, J.T., Dale, J.W., Eisenach, K.D., Gicquel, B., Hermans, P., Martin, C., McAdam, R., Shinnick, T.M. (1993), "Strain Identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA Fingerprinting: Recommendations for a Standardized Methodology", *Journal of clinical microbiology*, Vol. 31 No.2, pp. 406.
- Van Soolingen, D., De Haas, W. and Kremer, K. (2002), "Restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing of mycobacteria". National Institute of Public Health and environment. Bilthoven. Holanda.
- Wirth, T., Hildebrand, F., Allix-Béguec, C., Wölbeling, F., Kubica, T., Kremer, K., van Soolingen, D., Rüsch-Gerdes, S., Locht, C., Brisse, S., Meyer, A., Supply, P., and Niemann, S. (2008), "Origin, Spread and Demography of the Mycobacterium tuberculosis Complex", *PLoS Pathog*, Vol. 4, No. 9, pp. 1-10
- World Health Organization (2014), *WHO Report Global Tuberculosis Control*. World Health Organization. Geneva. Suiza.