Presencia del genotipo Beijing entre cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en dos centros de salud de la Región Metropolitana-Chile

Paulina Meza, M. Elvira Balcells, Carolina Miranda, Marcela Cifuentes, Aniela Wozniak y Patricia García

Presence of Beijing genotype among *Mycobacterium tuberculosis* strains in two centres of the Region Metropolitana of Chile

Background: Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex (cMtb) allows us to know geographically predominant lineages. Some lineages spread more rapidly and are associated with multidrug resistance, particularly Beijing, which has been reported in Latin America (Peru). There is little information about this topic in Chile and there are no reports of the presence of the Beijing genotype. **Aim:** To determine the most prevalent lineages in the Metropolitan Region of Chile with emphasis on the search for Beijing in two health centers. **Methods:** Two complementary molecular methods were used: spoligotyping, based on the variations of the direct repeat regions in the genome of cMtb and MIRU-VNTR, based in the variable number of tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units, and subsequent analysis in international databases. A designed lineage was assigned to 37 of the 43 strains studied (86%); 6 isolates could not be assigned to any genotype. LAM and T genotype were the most frequent (39.5 and 32.5%, respectively) followed by Haarlem (7.0%), Beijing (4.7%) and X (2.3%). **Conclusion:** We describe for the first time the presence of the Beijing genotype in Chile. cMtb molecular surveillance should be implemented in our country in order to know the dynamics of its transmission.

Key words: Molecular epidemiology, *Mycobacterium tuberculosis* complex, genotypes, MIRU-VNTR, spoligotyping, Beijing.

Palabras clave: Epidemiología molecular, complejo *Mycobacterium tuberculosis*, genotipos, MIRU-VNTR, espiligotipificación, Beijing.

Pontificia Universidad Católica de Chile.

Servicio de Laboratorios Clínicos
Laboratorio de Microbiología.
(PM, CM).

Escuela de Medicina
Departamento de Enfermedades
Infecciosas (EB).

Departamento de Laboratorios
Clínicos (AW, PG).

Hospital San Borja Arriarán,
Santiago.

Laboratorio de Microbiología (MC)

Proyecto financiado por Fondos
Departamentales Concursables
del Departamento de Laboratorios
Clínicos. Este Proyecto es parte
de una tesis para optar al grado
académico de Magister en Ciencias
Biomédicas otorgado por la
Universidad de Talca (P.M.A.)

Los autores declaran no tener
conflictos de interés.

Recibido: 16 de mayo de 2013
Aceptado: 24 de noviembre de
2013

Correspondencia a:
Patricia García Cañete
pgarcia@med.puc.cl

Introducción

La epidemiología molecular de la tuberculosis (TBC) ha aportado información de gran utilidad respecto de la transmisión de la enfermedad, utilizándose como un complemento a la epidemiología clásica. El conocimiento de los distintos genotipos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (cMtb) ha permitido conocer los tipos más prevalentes en determinadas localizaciones geográficas¹. Hoy se sabe que ciertos genotipos se diseminan con mayor rapidez (mayor transmisibilidad) o que causan enfermedad de mayor gravedad, asociado a la multi-resistencia; también se ha establecido relaciones entre los genotipos y la respuesta inmunológica del hospedero^{2,3} lo que justifica la necesidad de identificar aquellos prevalentes en cada país o región. Se han descrito como prevalentes en el mundo los genotipos Haarlem, Latino América-Mediterráneo, T, Este de África-India, Central-Asia, X y Beijing. El genotipo *Haarlem* (H), descrito en el año 1999⁴ en pacientes nederlenses, es prevalente en los Países Bajos y el norte de África donde ha causado brotes de tuberculosis multi-resistente. El

genotipo *Latino América-Mediterráneo* (LAM), el prevalente en Latinoamérica y España, sugiriendo orígenes comunes relacionado a la colonización hispana^{1,5,6}. El genotipo *T*, mal definido y localizado en países de varios continentes como Etiopía, Rusia, Madrid y Europa Central¹. El genotipo *Este de África-India* (EAI), muy frecuente en áreas del lejano Oriente, Asia y Oceanía^{1,7}. El genotipo *Central-Asia* (CAS) o *Delhi*, localizado en el Medio Oriente, Asia Central, Europa y Australia, lo que lo vincula con los inmigrantes del sur de Asia¹. El genotipo *X*, prevalente en América del Norte y regiones de América Central sugiriendo una ascendencia anglosajona o incluso afro-americana^{1,6} y por último el genotipo *Beijing*, endémico y con un claro predominio en ciertas regiones del extremo Oriente, Asia y Oceanía, exceptuando India subcontinental y Sudáfrica^{1,8,9}, se ha asociado a alta transmisibilidad, multi-resistencia^{8,10} y mayor poder patógeno asociado a la baja inducción de citoquinas inflamatorias, lo que permitiría un mayor crecimiento intracelular del cMtb^{2,11}. En los Estados Unidos de América, específicamente en Nueva York, en el año 1991, durante un brote que afectó a ocho pacientes

con TBC resistente a isoniácida, rifampicina, etambutol, estreptomycin, kanamicina, etionamida y rifabutina, se identificó el genotipo “W”, que fue posteriormente asociado a otros cinco brotes en hospitales del área de Nueva York. Este genotipo se relacionó estrechamente con el genotipo Beijing (Beijing W)^{12,13}. En América Latina, a pesar del bajo reporte de genotipo Beijing, éste ha sido detectado en forma significativa en cepas peruanas, tanto susceptibles como resistentes, lo cual podría explicarse por la migración asiática^{6,8}.

En Chile existe muy poca información sobre los genotipos predominantes del cMtb. En el año 2006, Mancilla y cols., reportaron las variantes genéticas (espoligotipos) de *M. tuberculosis* en la Región de Los Lagos, en cepas de 25 pacientes con TBC, no encontrándose el espoligotipo (ST) correspondientes al genotipo Beijing¹⁴. En el año 2008 y posteriormente en el año 2012, Ritacco y cols., en Buenos Aires, Argentina, estudiaron cepas de América Latina, incluyendo 35 y 13 cepas de Chile, respectivamente. Estos estudios no caracterizaron la totalidad de los cepas y sólo se describe el genotipo LAM en una cepa, sin encontrar el genotipo Beijing^{5,13}.

El objetivo de este trabajo fue conocer los genotipos prevalentes en dos centros de salud de la Región Metropolitana de Santiago de Chile con énfasis en la búsqueda del genotipo Beijing.

Material y Método

Obtención y caracterización de cepas del complejo M. tuberculosis

Se estudió inicialmente un total 107 cultivos positivos, sugerentes de cMtb, obtenidos entre los años 2008 y 2011 en forma consecutiva, procedentes de pacientes de la Red Salud UC y del Hospital Clínico San Borja-Arriarán. Los cultivos fueron mantenidos en los laboratorios de Microbiología de ambos centros en medio sólido o líquido. La identificación presuntiva fue realizada de acuerdo a características macroscópicas de las colonias. Los 107 cultivos fueron resembrados en medio sólido Lowenstein Jensen y se recuperaron solamente 47 cepas, de las cuales, 37 provenían de pacientes de la Red Salud UC y 10 de pacientes del Hospital Clínico San Borja-Arriarán. Se realizó la búsqueda en el Sistema Informático (SIL) de datos como edad, sexo y la comuna de los pacientes. Las 47 cepas estudiadas provenían de 44 pacientes, es decir, en 3 pacientes se incluyeron 2 cepas. De los 44 pacientes, 52% eran de sexo femenino; 64% de las muestras fueron obtenidas del tracto respiratorio, mayoritariamente muestras de expectoración. La comuna de residencia de los pacientes se distribuyó de la siguiente manera: 39% pertenecían a la comuna de Maipú, 25% a Santiago Centro y en 20% no se obtuvo el dato de residencia.

Extracción de ADN e identificación molecular del cMtb

Se tomaron entre una y cinco colonias sugerentes de cMtb y se emulsionaron en 300 µl de agua destilada para posteriormente realizar la inactivación con calor (20 min a 95°C) y lisado con sonicator (15 min). Luego se centrifugó 3 min a 13.000 rpm para obtener el sobrenadante que contiene el ADN, el que se almacenó a -20°C hasta su posterior uso. La identificación de las 47 cepas fue confirmada con una RPC convencional utilizando partidores que amplifican un fragmento de 1020 pares de bases del gen de la girasa B (*gyrB*), específico para cMtb, según el protocolo descrito por Kasai y cols.¹⁵.

Los partidores utilizados fueron MTUB f: 5'-TCG-GACGCGTATGCGATATC y MTUB r: 5' ACATACAG-TTCGGACTTGCG. Cada reacción de amplificación por RPC contenía: 12,5 µl premezcla 2X, 2 µl de cada partidor (*forward* y *reverso*) 10 µM, 0,2 µl de ADN polimerasa GoTaq-flexi (Promega®) 5U/µl, 5 µl de agua destilada libre de nucleasas y 5 µl de ADN de las muestras o controles (control negativo con agua destilada; control positivo con ADN de cMtb), con un volumen final de 25µl. El programa de amplificación fue del tipo *touch-down* que consiste en una denaturación inicial de 3 min a 95°C y 10 ciclos sucesivos en los cuales la denaturación es de 30 s a 95°C y la extensión de 30 s a 72°C. El *annealing* es de 30 s a 65°C para el primero de los 10 ciclos y cada ciclo sucesivo disminuye un °C hasta llegar a 56°C. Posteriormente ocurren 35 ciclos iguales de 30 s a 95°C, 30 s a 55°C y 30 s a 72°C. Por último, ocurre una extensión final de 10 min a 72°C. Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio, en tampón TAE y la visualización se realizó en transiluminador con luz UV.

Genotipificación por MIRU-VNTRs

La genotipificación por MIRU-VNTR se realizó mediante una RPC convencional, amplificando 12 de los 41 loci: 02, 04, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, 40. Las RPC se realizaron con los partidores descritos por Cowan y cols.¹⁶. La mezcla que se utilizó en la amplificación por RPC contenía: 12,5µl premezcla 2X, 2,5 µl de cada partidor (*forward* y *reverso*) 5 µM, 0,2 µl de la GoTaq flexi ADN polimerasa 5U/µl (Promega®), 5,3 µl de agua destilada libre de nucleasas y 2 µl de ADN de las muestras o controles, con un volumen final de 25µl. El programa de amplificación fue del tipo *touch-down* según lo descrito anteriormente. La visualización de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%-2% (según el tamaño esperado) teñidos con bromuro de etidio, en tampón TAE junto con un estándar de tamaño de 50 pb. Se calculó el número de repeticiones presentes para cada MIRU, en cada cepa de

acuerdo al tamaño del producto amplificado obtenido, según lo descrito por Cowan y cols.¹⁶.

Genotipificación por espoligotipificación

Se realizó con el *kit* comercial Ocimum Biosolutions BV®, India, de acuerdo a las instrucciones del fabricante^{17,18}. Este *kit* contiene partidores Dra y Drb que amplifican las secuencias conservadas de la región DR, controles positivos, membrana con oligos complementarios a cada uno de los 43 interespaciadores. Primero se realizó una RPC y los reactivos para la mezcla 1X fueron: 4 µl de partidores Dra y Drb (20 pmol), 4 µl dNTP MIX (2,5 mM de cada nucleótido), 5 µl tampón Tth (10x), 0,1 µl Tth polimerasa (5 unidades/µl), 4 µl de MgCL₂ (25 mM), 27 µl de agua libre de nucleasas y 2 µl de ADN de cada una de las cepas a estudiar. Se utilizaron dos controles positivos: *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG P3 y un control negativo (agua destilada). El programa de amplificación utilizado consistió en denaturación inicial a 96°C por 3 min, seguido de 20 ciclos de denaturación a 96°C por 1 min, *annealing* a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 30 seg, y con una extensión final a 72°C por 5 min. El producto amplificado fue denaturado a 99 °C por 10 min y a continuación hibridado contra la membrana utilizando el soporte Miniblotter MN 45. La membrana contenía los 43 oligonucleótidos complementarios, fijados covalentemente, derivados de la región espaciadora de las DR de las cepas de *M. bovis* P3 y *M. tuberculosis* H37Rv. Luego de una incubación con calor y posteriores lavados se incubó la membrana hibridada con un conjugado de estreptavidina- peroxidasa (Roche) para luego realizar una reacción de quimioluminiscencia con el sistema ECL (Amersham) y finalmente fue revelado con sistema fotográfico. La determinación de la presencia o ausencia del espaciador se realizó visualmente. Los patrones observados se registraron en formato binario para el posterior análisis de la relación filogenética entre las cepas en las bases de datos (miru-vntrplus y del Instituto Pasteur-Guadeloupe).

Bases de datos

Se ingresaron los resultados de genotipificación por MIRU-VNTR y espoligotipificación a las bases de datos SITVITWEB para obtener MIRU International Type (MIT) y Spoligotyping International Type (SIT), respectivamente (URL: http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/)¹⁹. Para obtener genotipos se ingresaron a la base de datos MIRU-VNTRplus (URL: <http://www.miru-vntrplus.org/>)^{20,21}.

El estudio fue presentado y aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de la Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile (CEI-UC) con el número de proyecto 12-016.

Resultados

De las 47 cepas estudiadas, 43 fueron positivas en la amplificación del gen *gyrB*, confirmando que pertenecen al cMtb, las que finalmente fueron consideradas en los resultados.

Análisis de MIRU-VNTR

Se obtuvo productos de amplificación para las 43 cepas en los 12 tipos de MIRU estudiados, mediante 12 RPC para cada cepa. La frecuencia del número de repeticiones para cada tipo de MIRU, para todas las cepas estudiadas, se muestra en la Tabla 1. En algunas cepas para los MIRU31 y MIRU40, se obtuvo un tamaño del producto amplificado menor que lo descrito para una repetición, por lo que el dígito asignado fue cero. El número de repeticiones resultantes permite obtener el patrón de 12 dígitos, en el que cada número representa el número de repeticiones para cada tipo de MIRU. La introducción del patrón de 12 dígitos en la base de datos SITVITWEB permite obtener el número MIT (MINU international type). Estos resultados se muestran en la Tabla 2. Se obtuvo un resultado de MIT para 25 de las 43 cepas estudiadas (58%). Los 18 restantes, corresponden a series MIT no definidas en la base de datos (huérfanas). De los 25 MIT obtenidos, 19 son diferentes entre sí y 6 corresponden a dos grupos de 2 y 4 MIT idénticos entre sí, siendo este último, MIT 190 (patrón 124326153220), la agrupación más frecuente.

Análisis de espoligotipo

El análisis de las 43 cepas mostró que había 25 patrones (espoligotipos) diferentes. La introducción de los

Tabla 1. Distribución del número de repeticiones (VNTR) para cada tipo de MIRU en las 43 cepas estudiadas

Número de repeticiones (%)									
MIRU	0	1	2	3	4	5	6	7	8
02		9 (20,9)	34 (79,1)	-	-	-	-	-	-
04	-	1 (2,3)	42 (97,7)	-	-	-	-	-	-
10	-	-	1 (2,3)	13 (30,3)	28 (65,1)	-	1 (2,3)	--	
16	-	1 (2,3)	9 (20,9)	30 (69,8)	3 (7,0)	-	-	-	-
20	-	4 (9,3)	39 (90,7)	-	-	-	-	-	-
23	-	2 (4,7)	-	-	-	20 (46,5)	20 (46,5)	-	1 (2,3)
24	-	43 (100)	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	8 (18,6)	8 (18,6)	21 (48,8)	3 (7,0)	3 (7,0)	-
27	-	1 (2,3)	1 (2,3)	39 (90,7)	2 (4,7)	-	-	-	-
31	1 (2,3)	-	17 (39,6)	24 (55,8)	-	1 (2,3)	-	-	-
39	-	-	41 (95,3)	2 (4,7)	-	-	-	-	-
40	6 (14,0)	1 (2,3)	5 (11,6)	12 (27,9)	9 (20,9)	3 (7,0)	7 (16,3)	-	-
MIRU: <i>micobacterial interspersed repetitive unit</i> . VNTR: <i>variable number tandem repeat</i> .									

MIRU: *micobacterial interspersed repetitive unit*. VNTR: *variable number tandem repeat*.

Tabla 2. Número de repeticiones (MIRU-VNTR) y MIT para las cepas estudiadas

n de cepas	02	04	10	16	20	MIRU								MIT*
						23	24	26	27	31	39	40		
37	2	2	3	4	2	5	1	3	3	3	2	2	340	
39	2	2	4	3	1	5	1	5	3	3	2	3	27	
42	2	2	4	2	1	6	1	4	3	2	2	0	huérfana	
43	2	2	4	2	1	6	1	4	3	2	2	0	huérfana	
47	2	2	3	4	2	5	1	5	3	3	2	2	157	
50	2	2	4	3	2	6	1	5	2	2	2	5	huérfana	
51	2	2	3	3	2	5	1	5	4	3	2	4	huérfana	
54	2	2	4	3	2	5	1	5	3	3	2	5	35	
55	2	2	4	3	2	6	1	3	3	3	2	2	huérfana	
56	1	2	4	3	2	8	1	5	3	3	2	6	180	
65	1	1	3	3	2	6	1	5	3	2	2	6	huérfana	
66	2	2	3	3	2	1	1	4	3	3	2	4	huérfana	
68	2	2	6	3	2	5	1	5	3	3	2	3	110	
71	2	2	4	3	2	5	1	5	3	3	2	4	34	
74	2	2	4	3	2	6	1	3	3	3	2	4	313	
75	2	2	3	4	2	5	1	5	3	3	2	2	157	
76	1	2	4	2	2	6	1	5	3	2	2	2	179	
77	2	2	2	3	2	1	1	5	3	3	2	5	huérfana	
78	2	2	4	3	2	5	1	4	3	3	2	4	117	
79	2	2	3	2	2	6	1	6	3	2	2	6	huérfana	
80	2	2	4	2	2	5	1	4	3	2	2	4	huérfana	
81	1	2	4	3	2	6	1	5	4	2	2	6	huérfana	
82	1	2	4	3	2	6	1	5	3	2	2	0	190	
83	1	2	4	3	2	6	1	5	3	2	2	0	190	
84	2	2	4	2	2	6	1	3	3	3	2	3	huérfana	
85	2	2	4	3	2	6	1	6	3	3	2	1	375	
86	1	2	4	3	2	6	1	5	3	2	2	0	190	
87	2	2	4	2	2	6	1	3	3	3	2	3	huérfana	
88	1	2	4	3	2	6	1	5	3	2	2	0	190	
89	2	2	3	3	2	5	1	5	3	3	2	4	125	
90	2	2	4	3	2	6	1	3	3	3	2	3	251	
91	2	2	4	3	2	5	1	4	3	2	2	4	huérfana	
92	1	2	4	3	2	6	1	5	3	2	2	6	151	
93	2	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3	3	721	
94	2	2	4	3	2	6	1	3	3	3	2	3	251	
95	2	2	4	3	2	5	1	4	3	2	2	3	377	
96	2	2	3	3	2	5	1	7	3	3	3	3	721	
97	2	2	3	3	2	5	1	5	3	3	2	6	huérfana	
98	2	2	3	1	2	5	1	5	3	3	2	6	733	
100	2	2	4	2	2	6	1	3	3	0	2	3	huérfana	
103	2	2	3	2	1	5	1	4	3	2	2	4	huérfana	
105	2	2	4	3	2	5	1	6	1	2	2	3	huérfana	
106	2	2	4	3	2	5	1	7	3	5	3	3	229	

MIRU: *micobacterial intersperse repetitive unit*. VNTR: *variable number tandem repeat*. MIT: *MIRU international type*. *El MIT para cada patrón de 12 dígitos fue obtenido en la base de datos del Instituto Pasteur-Guadeloupe (SITVITWEB).

espoligotipos en la base de datos SITVITWEB, permitió obtener el número SIT en 19 de ellos, mientras que 6 patrones correspondieron a perfiles huérfanos (sin SIT).

Los cuatro SIT más frecuentes corresponden al SIT42 (ausencia del espaciador 21 al 24 y del 33 al 36), SIT33 (ausencia del espaciador 9 al 11, 21 al 24 y 33 al 36), SIT53 (ausencia del espaciador desde 33 al 36), y SIT 52 (ausencia del espaciador 33 al 36 y 40), encontrados en 8, 4, 4 y 3 cepas, respectivamente. También se encontró el SIT 1 ($n = 2$ cepas) que se caracteriza por la ausencia de los interespaciadores 1 al 34 en la región DR. Los resultados de espoligotipo y los SIT encontrados para cada cepa se muestran en la Tabla 3.

Genotipos

Para 86% (37/43) de las cepas estudiadas fue asignado un genotipo previamente descrito en la literatura, mientras que al 14% restante no se le asignó alguno, ("huérfanas"). Los resultados de la distribución de los genotipos y subgenotipos se muestran en la Tabla 4, donde se observa que el genotipo más frecuente fue el LAM (39,5%), seguido por el genotipo T (32,5%), genotipo H (7,0%), genotipo Beijing (4,7%) y genotipo X (2,3%).

Discusión

Este es el primer estudio realizado en Santiago de Chile que describe los genotipos del cMtb, basado en dos metodologías complementarias (MIRU-VNTR y espoligotipificación). Se describe además el genotipo Beijing y se demuestra la predominancia del genotipo LAM y T. Estudios latinoamericanos más extensos realizados en Brasil, Argentina, Venezuela, Paraguay, Perú, Guayana-Francesa y Colombia muestran una clara predominancia del genotipo LAM en relación a los genotipos T y Haarlem^{1, 6,22-27}.

Nuestro estudio encuentra que ambos LAM y T son los más frecuentes en porcentajes relativamente similares (39,5 y 32,5%, respectivamente); en cambio, el genotipo Haarlem, que en algunos países ocupa la segunda frecuencia (Argentina, Colombia, Perú y Paraguay), en este estudio corresponde a sólo 7% de las cepas halladas^{6,24,26,27}.

El hallazgo en nuestro país de dos cepas del genotipo Beijing motiva a continuar el estudio ampliando el número de cepas y las zonas geográficas a estudiar. Lamentablemente, en el presente trabajo no disponemos de mayor información clínico/epidemiológica de los pacientes, como nacionalidad, co-infección por VIH u otra condición asociada a la enfermedad. Sin embargo, es necesario continuar estos estudios ya que el genotipo Beijing se ha asociado a mayor transmisibilidad, un curso de la enfermedad más agresivo y circulación de cepas de cMtb multi-resistente.

Tabla 3. Patrones de espoligotipos y SIT obtenidos en todas las cepas estudiadas																																											
n aislamiento	Espoligotipo*																															SIT#											
37	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	huérfana		
39	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	219	
42	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	42	
43	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	42	
47	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	53	
50	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	64	
51	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	53	
54	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	336	
55	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	33
56	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	42
65	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	42
66	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1877
68	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	746
71	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	52
74	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	huérfana
75	1	1																																									

SIT: *spoligotyping* *international type*. * Para cada uno de las cepas se obtuvo un perfil alélico de 43 dígitos, que consiste en colocar un número 1 en presencia de la banda y 0 en ausencia de la banda. # El SIT para cada perfil fue obtenido en ambas bases de datos (MIRU-VNTRplus y SITVITWEB).

Finalmente, es llamativo que 14% de las cepas estudiadas correspondieron a cepas no previamente clasificadas (cepas huérfanas), siendo esta proporción solamente superada por estudios realizados en Brasil²². Será de interés en estudios futuros con un mayor número de cepas corroborar si se mantiene esta proporción y determinar si alguna de estas pudiese corresponder a un clon “chileno” no previamente descrito.

Tabla 4. Distribución de genotipos y subgenotipos obtenidos en 43 cepas del cMtb

n de cepas (%)	Genotipo	Subgenotipos
17 (39,5)	LAM	LAM9 (n = 10), LAM3 (n = 6), LAM6 (n = 1)
14 (32,5)	T	T1 (n = 9), T2 (n = 3), T4-CEU1 (n = 2)
3 (7,0)	H	H3 (n = 3)
2 (4,7)	Beijing	-
1 (2,3)	X	X1 (n = 1)

cMTb: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

El presente estudio destaca la importancia de conocer los genotipos predominantes en Chile, como varían en el tiempo y determinar la dinámica de la transmisión. La creciente inmigración, con nuevas cepas de *M. tuberculosis*, supone un reto de vigilancia epidemiológica en las que los estudios moleculares jugarán un rol importante en el control y contención de la enfermedad.

Resumen

Introducción: La genotipificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (cMtb) permite conocer los genotipos geográficamente predominantes. Algunos genotipos se diseminan con mayor rapidez y se asocian a multi-resistencia, tal como Beijing, reportado en América Latina en Perú. Existe poca información al respecto en Chile, sin reportes de la presencia de Beijing. **Objetivo:** Conocer los genotipos prevalentes en dos

centros de salud de la Región Metropolitana de Chile con énfasis en la búsqueda de Beijing. **Métodos:** Se utilizaron dos métodos moleculares complementarios basados en la variación de las regiones de repeticiones directa en el genoma de *M. tuberculosis* (espoligotipificación) y número variable de repeticiones en *tandem* de las unidades repetitivas de interespañadores micobacterianos (MIRU-VNTRs) y posterior análisis en bases de datos internacionales. **Resultados:** Se asignó un genotipo conocido a 37 de las 43 cepas estudiadas (86%), mientras que en 14% no se asignó ninguno. Los genotipos LAM y T fueron los más frecuentes (39,5 y 32,5%, respectivamente), seguidos por Haarlem (7,0%), Beijing (4,7%) y X (2,3%). **Conclusión:** Se describe por primera vez en Chile la presencia del genotipo Beijing en cepas de cMtb. Es necesario realizar una vigilancia epidemiológica molecular en el cMtb para conocer la dinámica de la transmisión en nuestro país.

Referencias bibliográficas

- Brudey K, Driscoll J R, Rigouts L, Prodinger W M, Gori A, Al-Hajj S A, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol 2006; 6: 23.
- Pareek M, Evans J, Innes J, Smith G, Hingley-Wilson S, Loughheed K E, et al. Ethnicity and mycobacterial lineage as determinants of tuberculosis disease phenotype. Thorax 2013; 68 (3): 221-9.
- Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S, et al. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103 (8): 2869-73.
- Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas W H, Hermans P W, 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. J Clin Microbiol 1999; 37 (8): 2607-18.
- Ritacco V, Iglesias M J, Ferrazoli L, Monteserin J, Dalla Costa E R, 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.
- Taype C A, Agapito J C, Accinelli R A, Espinoza J R, Godreuil S, Goodman S J, et al. Genetic diversity, population structure and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru. Infect Genet Evol 2012; 12 (3): 577-85.
- Kallenius G, Koivula T, Ghebremichael S, Hoffner S E, Norberg R, Svensson E, et al. Evolution and clonal traits of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Guinea-Bissau. J Clin Microbiol 1999; 37 (12): 3872-8.
- Iwamoto T, Grandjean L, Arikawa K, Nakanishi N, Caviades L, Coronel J, et al. Genetic diversity and transmission characteristics of Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru. PLoS One 2012; 7 (11): e49651.
- Mokrousov I, Ly H M, Otten T, Lan N N, Vyshnevskiy B, Hoffner S, et al. Origin and primary dispersal of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: clues from human phylogeography. Genome Res 2005; 15 (10): 1357-64.
- Von Groll A, Martin A, Félix C, Prata P F, Honscha G, Portaels F, et al. Fitness study of the RDRio lineage and Latin American-Mediterranean family of *Mycobacterium tuberculosis* in the city of Rio Grande, Brazil. FEMS Immunol Med Microbiol 2010; 58 (1): 119-27.
- Mathema B, Kurepina N, Yang G, Shashkina E, Manca C, Mehaffy C, et al. Epidemiologic consequences of microvariation in *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis 2012; 205 (6): 964-74.
- Plikaytis B B, Marden J L, Crawford J T, Woodley C L, Butler W R, Shinnick T M. Multiplex PCR assay specific for the multidrug-resistant strain W of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1994; 32 (6): 1542-6.
- Ritacco V, López B, Cafrune P I, Ferrazoli L, Suffys P N, Candia N, et al. *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype are rarely observed in tuberculosis patients in South America. Mem Inst Oswaldo Cruz 2008; 103 (5): 489-92.
- Mancilla E M, Martínez H A, Palavecino B C, Rehren S G, Lucero L P, Leon R G, et al. Genetic variants of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients of the Xth Region of Chile. Rev Chilena Infectol 2006; 23 (3): 220-5.
- Kasai H, Ezaki T, Harayama S. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their gyrB sequences. J Clin Microbiol 2000; 38 (1): 301-8.
- Cowan L S, Mosher L, Diem L, Massey J P, Crawford J T. Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. J Clin Microbiol 2002; 40 (5): 1592-602.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 1997; 35 (4): 907-14.
- Abadia E, Zhang J, Ritacco V, Kremer K, Ruimy R, Rigouts L, et al. The use of microbead-based spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex to evaluate the quality of the conventional method: providing guidelines for Quality Assurance when working on membranes. BMC Infect Dis 2011; 11: 110.
- 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.
- 20.- Shabbeer A, Ozcaglar C, Yener B, Bennett K P. Web tools for molecular epidemiology of tuberculosis. Infect Genet Evol 2012; 12 (4): 767-81.
- 21.- Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harmsen D. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. Nucleic Acids Res 2010; 38 (Web Server issue): W326-31.
- 22.- Gomes H M, Elias A R, Oelemann M A, Pereira M A, Montes F F, Marsico A G, et al. Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from patients residents of 11 states of Brazil. Infect Genet Evol 2012; 12 (4): 649-56.
- 23.- Gonzalo X, Ambroggi M, Cordova E, Brown T, Poggi S, Drobniewski F. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*, Buenos Aires, Argentina. Emerg Infect Dis 2011; 17 (3): 528-31.
- 24.- Ritacco V, López B, Ambroggi M, Palmero D, Salvadores B, Gravina E, et al. HIV infection and geographically bound transmission of drug-resistant tuberculosis, Argentina. Emerg Infect Dis 2012; 18 (11): 1802-10.
- 25.- Aristimuno L, Armengol R, Cebollada A, Espana M, Guilarte A, Lafoz C, et al. Molecular characterisation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the First National Survey of Anti-tuberculosis Drug Resistance from Venezuela. BMC Microbiol 2006; 6: 90.
- 26.- Candia N, López B, Zozio T, Carrivale M, Díaz C, Russomando G, et al. First insight into *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity in Paraguay. BMC Microbiol 2007; 7: 75.
- 27.- Cerezo I, Jiménez Y, Hernández J, Zozio T, Murcia M I, 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.