

**Tuberculosis: de la clínica al laboratorio,
y del laboratorio al paciente y al sistema de salud.
Un ejemplo de Medicina traslacional**

Autores:

Investigador principal:

Dr. Gonzalo Greif¹

Investigadores Asociados:

Dr. Carlos Robello^{1,2}, Mag. Joaquín Hurtado^{1,3}, Dr. Nicolás Nin⁴, Dra. María Buroni⁴, Dr. Alvaro Giordano⁴, Dra. Cecilia Coithiño⁵, Dr. Fernando Rodríguez⁴.

Afiliaciones:

1. Laboratorio de interacciones hospedero patógeno. Institut Pasteur de Montevideo.
2. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina. Universidad de la República.
3. Laboratorio de evolución experimental de virus. Institut Pasteur Montevideo. (afiliación actual)
4. Unidad de Medicina Intensiva. Hospital Español Dr. "Juan J. Crottogini". ASSE. Montevideo. Uruguay
5. Laboratorio de Microbiología. Comisión Honoraria de Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes (CHLA-EP). Montevideo. Uruguay

Financiación:

Este Proyecto de Investigación ha sido financiado en parcialmente por ANII – Fondo Sectorial de Salud 2016 (FSS_X_2016_1_127692), Fondo María Viñas (FMV_3_2018_1_148367), Pedeciba.

Los Dres. Gonzalo Greif, Carlos Robello y Nicolas Nin forman parte del Sistema Nacional de Investigadores.

Joaquín Hurtado desarrolló su trabajo de Maestría financiado por Pedeciba (alícuotas investigador y estudiante) y recibió una beca de finalización de carrera de la Comisión Académica de Posgrado (Universidad de la República) en el marco de este trabajo.

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Resumen

Introducción. La tuberculosis (TB) es una de las primeras causas de muerte asociadas a un solo agente infeccioso en el mundo. En el año 2020 se registraron 10,4 millones de casos nuevos y 1,3 millones de muertes. La enfermedad causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* es prevenible y curable. Sin embargo, en las últimas décadas, Uruguay viene experimentando un aumento lento pero sostenido en la incidencia de los casos, opuesto a la tendencia mundial y regional. Asimismo, se ha observado un incremento en los casos graves que requieren internación en unidades de cuidados intensivos. Existen siete linajes descritos dentro de *Mycobacterium tuberculosis*, de los cuales algunos son asociados con un peor pronóstico y mayor ocurrencia de resistencia a fármacos. Conocer los linajes que circulan en la población es información importante para identificar la aparición de brotes, detectar resistencia y prevenir el aumento de casos. Pero no sólo un seguimiento epidemiológico exhaustivo y con toda la información posible es necesario para controlar esta enfermedad, el desarrollo de un diagnóstico temprano mejoraría enormemente las posibilidades de éxito en el tratamiento del paciente con TB. Como la confirmación del diagnóstico clínico implica en muchos casos esperar el resultado del cultivo de la bacteria, insumiendo varias semanas, contar con un marcador molecular de enfermedad al pie de cama resultaría valioso para acortar estos plazos. Por lo que, profundizando en la respuesta del hospedero, se realizó la búsqueda de ARNs pequeños circulantes en suero de una población de pacientes con TB grave que requirieron internación en Cuidados Intensivos (UCI). En nuestro laboratorio, hemos participado en la implementación de técnicas de biología molecular en el estudio de las cepas circulantes de *M. tuberculosis* en el país desde hace 10 años. Utilizando técnicas ya estandarizadas internacionalmente caracterizamos diferentes poblaciones de interés (incluidas aquellas cepas que provocaron casos graves). Asimismo, en esta interacción con médicos intensivistas del Hospital Español (centro de referencia de TB grave en el país) buscamos nuevas herramientas pronósticas y de la enfermedad, claves para realizar tratamiento personalizados y evitar muertes producidas por esta enfermedad.

Objetivos. El presente trabajo incluye los objetivos generales llevados adelante por nuestro laboratorio en estos 10 años de trabajo en Tuberculosis. Por un lado, el desarrollo de un sistema de tipificación de cepas basado en tecnologías de secuenciado profundo que permitió la caracterización de cepas circulantes en el sistema penitenciario, y se encuentra en etapa de transferencia a la Comisión Honoraria de Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes para su uso en el estudio de brotes y caracterización de aislados de la población uruguaya. Por otra parte, enfocando el estudio de pacientes con tuberculosis severa, el objetivo fue la búsqueda de marcadores moleculares con valor pronóstico que permita una clasificación de la gravedad de la enfermedad al ingreso a la UCI.

Resultados. En este trabajo se desarrolló por un lado un método de tipificación de cepas basado en secuenciado profundo de regiones de interés del genoma bacteriano, permitiendo no sólo la caracterización de brotes (análisis epidemiológico molecular de cepas), sino también determinar la posible resistencia a fármacos de las cepas analizadas. Esta herramienta, que ha sido transferida a la CHLAT-EP podría permitir la obtención de datos epidemiológicos de importancia para llevar adelante acciones de salud pública que permitan un mejor manejo de la enfermedad a nivel global. Por otra parte, el trabajo con médicos intensivistas, a través de la caracterización de aislados de pacientes graves y la búsqueda de marcadores moleculares de la gravedad de la enfermedad, se

encontraron dos moléculas (micro ARNs –miARN-) circulantes en suero de pacientes que mostraron un valor pronóstico de la severidad de la enfermedad, discriminando entre aquellos pacientes que fallecieron en la UCI de aquellos que superaron la internación. Este descubrimiento, debe terminar de validarse y extenderse a un mayor número de pacientes, pero de confirmarse sería un avance de vital importancia para el manejo de estos pacientes desde la clínica.

Conclusiones. El trabajo llevado adelante en el estudio de la Tuberculosis, con un abordaje global del problema, generando interacciones y sinergias entre investigadores básicos, médicos intensivistas, epidemiólogos, laboratoristas ha permitido la generación de una herramienta que podrá aportar a la toma de decisiones de Salud Pública en cuanto al manejo de la enfermedad y ha permitido el estudio de un grupo de pacientes con tuberculosis severa y encontrar dos miARNs circulantes en suero de pacientes al ingreso de la UCI con valor pronóstico del desarrollo de la enfermedad. De validarse estos marcadores constituirán un aporte del laboratorio al manejo de estos pacientes y convirtiéndose en un caso exitoso de medicina traslacional.

Palabras clave. *Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculosis, Tuberculosis pulmonar, Medicina Intensiva, Epidemiología molecular, miARNs, Diagnóstico.

Abstract

Introduction. Tuberculosis (TB) is one of the leading causes of death associated with a single infectious agent in the world. In 2020, 10.4 million new cases and 1.3 million deaths were recorded. Disease caused by the bacterium *Mycobacterium tuberculosis* is preventable and curable, however in recent decades, Uruguay has experienced a slow but sustained increase in the incidence of cases, contrary to the global and regional trend. In addition, an increase in severe cases requiring hospitalization in intensive care units (ICU) has been observed. There are seven lineages described within *Mycobacterium tuberculosis*, some of which are associated with a worse prognosis and greater occurrence of drug resistance. Knowing the lineages that circulate in the population is important information to identify the appearance of outbreaks, detect resistance and prevent an increase in cases. But not only an exhaustive epidemiological follow-up is necessary to control this disease, the development of an early diagnosis would greatly improve the chances of success in the treatment of the TB patient. As the confirmation of the clinical diagnosis implies in many cases waiting for the result of the culture of the bacteria, taking several weeks, having a molecular marker of disease at the bedside would be valuable to shorten these periods. Therefore, looking at the host response, a search was made for circulating small RNAs in the serum of a population of patients with severe TB who required hospitalization in ICU.

In our laboratory, we have participated in the implementation of molecular biology techniques in the study of circulating strains of *M. tuberculosis* in the country for 10 years. Using internationally standardized techniques, we characterize different populations of interest (including those strains that caused severe cases). Likewise, in this interaction with IVU doctors from the Hospital Español (reference center for severe TB in the country) we look for new prognostic and disease tools, keys to carry out personalized treatment and avoid deaths caused by this disease.

Aims. The present work includes the main aim carried out by our laboratory in these 10 years of work in Tuberculosis. On the one hand, the development of a strain typing system based on deep sequencing technologies that allowed the characterization of circulating strains (using the study of circulating strains in the prison system as a proof of concept), for its use in the study of outbreaks and characterization of isolates from the Uruguayan population. On the other hand, focusing on the study of patients with severe tuberculosis, the objective was the search for molecular markers with prognostic value that allow a classification of the severity of the disease on admission to the ICU.

Results. In this work, we developed a strain typing method based on deep sequencing of regions of interest in the bacterial genome, allowing not only the characterization of outbreaks (molecular epidemiological analysis of strains), but also determining the possible resistance to drugs of the strains analyzed. This tool, which has been transferred to the CHLAT-EP, could allow obtaining important epidemiological data to carry out public health actions that allow better management of the disease at a global level. On the other hand, the work with clinical doctors at the ICU, through the characterization of isolates from seriously ill patients and the search for molecular markers of the severity of the disease, we founded two molecules (micro RNAs -miRNA-) circulating in the serum of patients that showed a prognostic value of the severity of the disease, discriminating between those patients who died in the ICU from those who survived hospitalization. This discovery must be validated and extended to a greater number of patients, but if it is confirmed it would be a vitally important advance for the management of these patients from the clinic

Conclusions. The work carried out in the study of Tuberculosis, with a global approach to the problem, generating interactions and synergies between basic researchers, intensive care doctors, epidemiologists, laboratory specialists, has allowed the generation of a tool that can contribute to Public Health decision making in terms of disease management and has allowed the study of a group of patients with severe tuberculosis. We can identify two circulating miRNAs in the serum of these patients upon admission to the ICU with prognostic value for the development of the disease. If these markers are validated, they will constitute a laboratory contribution to the management of these patients and will become a successful case of translational medicine.

Keywords. *Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculosis, Intensive medicine, Molecular epidemiology, miARNs, Diagnosis, Prognosis.

INTRODUCCION

1. Importancia del tema.

La tuberculosis (TB), una enfermedad infecciosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), ha sido un desafío permanente a lo largo de la historia de la humanidad y continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial al día de hoy. Los primeros documentos describiendo la enfermedad se remontan entre 3300 y 2300 años atrás encontrados en India y China respectivamente ¹. En la actualidad, produce anualmente en el entorno de 10 millones de infecciones en humanos y causó la muerte de 1,5 millones de personas en 2020 ², superando al VIH como el agente infeccioso causante de más muertes a nivel mundial en el año 2019 y sólo superado en 2020 y 2021 por el SARS-CoV-2, causante de la pandemia de COVID-19.

Pese a ser una enfermedad curable y prevenible, los datos de incidencia y número de muertes no se lograron reducir según las metas previstas por el programa STOP-TB lanzado en 2015 por la OMS (reducción de 20% de nuevos casos -comparado con 2015- y del 35% de muertes producidas anualmente por la enfermedad para el 2020 ³.

Además, la pandemia produjo un retroceso significativo en los avances que se venían observando desde 2015, provocando a nivel mundial (Figura 1) (y también en nuestro país (Figura 2)) la disminución del número de diagnósticos realizados así como el abandono del tratamiento en muchos casos. Esto último puede potenciar la aparición de brotes de resistencia a fármacos, generando no sólo más costos al sistema de salud, sino aumentando mayores muertes por la enfermedad. Cabe mencionar, respecto a la aparición de cepas resistentes, que de las personas con tuberculosis activa cerca del 85% son curadas a través de un tratamiento que implica la utilización de cuatro fármacos llamados de primera línea: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (EMB) y pirazinamida (PZA) administrados de forma diaria durante 6 meses. La aparición de cepas resistentes a estos fármacos constituye un problema adicional debido al costo de fármacos de segunda línea, los efectos secundarios que estos generan y la baja adherencia al tratamiento que en estos casos se extiende por al menos 1 año.

En nuestro país en particular se venía notando un incremento en el número de casos desde 2006, de forma lenta pero sostenida (Figura 2), lo que genera una preocupación y una alerta de salud pública.

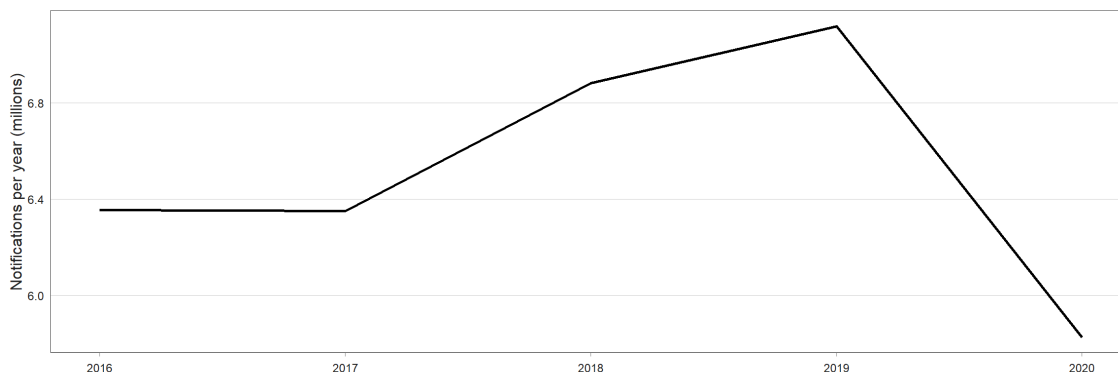


Figura 1. Casos diagnosticados TB (pre y post pandemia). Tomado de ².

Tuberculosis: de la clínica al laboratorio y del laboratorio al paciente

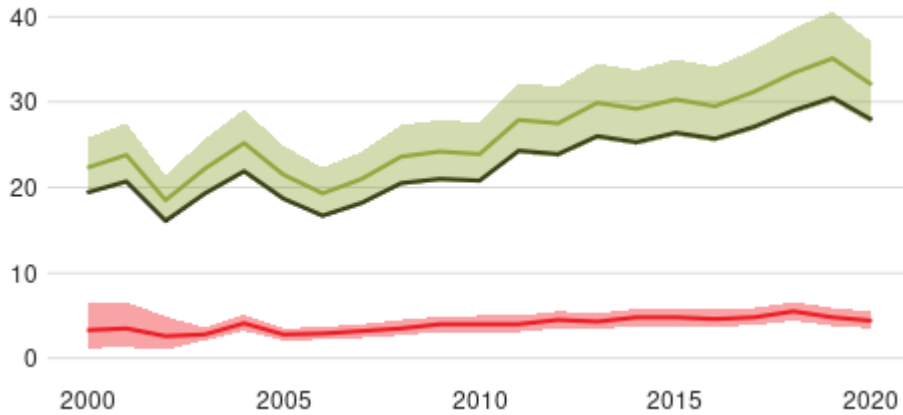


Figura 2. En verde se muestra la incidencia y la línea negra indica los nuevos casos (por 100000 habitantes). Datos tomados de ².

En el reporte 2021, de la organización mundial de la salud se realiza una estimación del cambio de tendencia en el número de muertes provocadas por TB hasta 2025 considerando la irrupción de la pandemia y la situación con la tendencia sin considerar este fenómeno. La Figura 3 muestra claramente el impacto a futuro de la pandemia y la continuación de la TB como problema de salud mundial al no poder cumplirse los objetivos trazados por el programa END-TB (meta final de reducción de 80% de nuevos casos y reducción de 90% el número de muertes por TB para 2035).

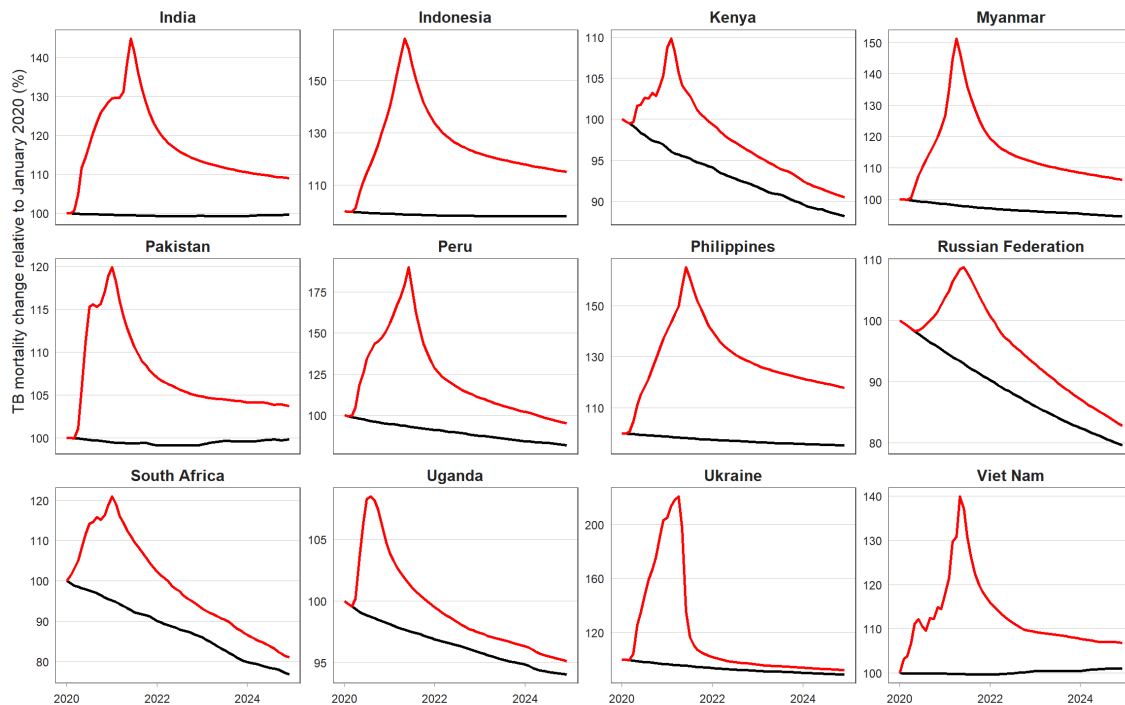


Figura 3. Porcentaje de incremento de mortalidad (respecto a 2020) proyectada para países seleccionados. Línea negra, tendencia proyectada de número de muertes por TB asumiendo no COVID-19, línea roja impacto modelado de la pandemia de COVID-19. Tomado de ²

2. Tuberculosis

La tuberculosis se transmite de persona a persona y es transmitida en general de forma aérea a través de partículas expelidas en la tos y afecta principalmente a adultos mayores de 45 años, siendo más frecuente en hombres que mujeres. La mayoría de las personas que se infectan con *M. tuberculosis* son asintomáticas y se estima que cerca de un cuarto de la población mundial se encuentra infectada. En la mayoría de los casos la infección es contenida y la bacteria entra en estado de latencia (LTBI: latent tuberculosis infection) y solamente entre 5-10% de personas infectadas desarrollarán la enfermedad activa (Figura 4). La probabilidad de la activación de la enfermedad aumenta notoriamente entre personas con VIH, personas inmunodeprimidas y también con comorbilidades como desnutrición, diabetes, fumadores y alcoholistas.

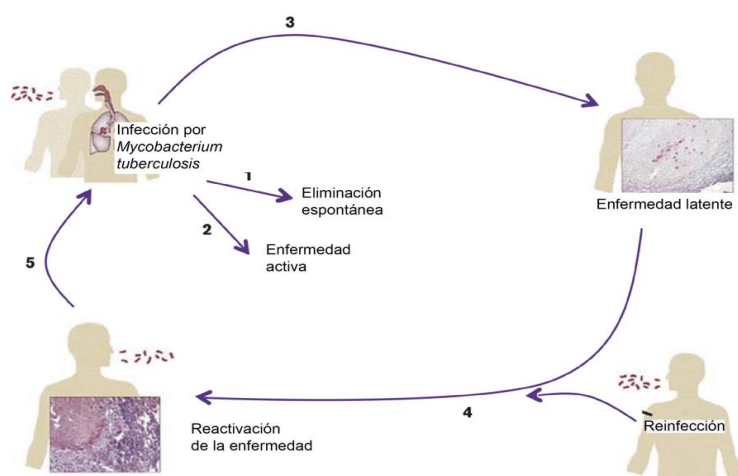


Figura 4. Ciclo de infección de Mtb. El contagio se da por inhalación de aerosoles y pueden ocurrir varios escenarios: (1) eliminación inmediata de la bacteria por el sistema inmune, (2) progresión a una infección activa de TB, (3) la infección no progresa a la enfermedad, sino que es contenida en el hospedero y entra en fase de latencia, (4) en algún momento de la vida del individuo, la TB en latencia puede progresar a la enfermedad o el individuo puede re-infectarse (5). En TB activa se puede dar la diseminación y la transmisión. Imagen modificada de ⁴.

Esta enfermedad afecta principalmente los pulmones (aunque también pueden afectar otros órganos), cuando las pequeñas partículas de *Mtb* logran llegar hasta el tracto respiratorio bajo donde son fagocitadas por los macrófagos y células dendríticas residentes. Dentro de los pulmones se dispara una respuesta inflamatoria local con el objetivo de activar la respuesta inmune innata y reclutar células inmunes al sitio de infección. De esta manera se forma un agregado de varios tipos de células (macrófagos, neutrófilos, células T, etc) llamado granuloma (Figura 5), que es un marcador histopatológico de la enfermedad ⁵.

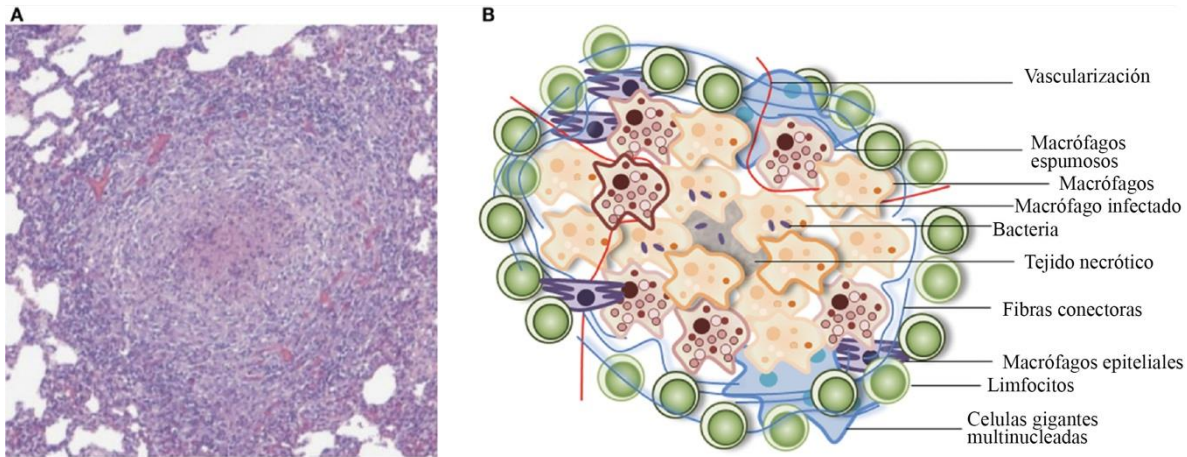


Figura 5. Arquitectura de un granuloma. (A) Muestra histológica obtenida de tejido pulmonar de cerdo con tinción hematoxilina-eosina. Granuloma representativo con centro necrótico. (B) Esquema de los componentes celulares que forman parte del granuloma. Imagen modificada de 6.

3. *Agente causante:*

La bacteria causante de la TB es como ya mencionamos la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Se trata de un bacilo que carece de motilidad, es ácido-alcohol resistente y débilmente Gram-positivo. Microscópicamente se observan como bastones rectos o curvos de 1 a 4 μm de largo. Mtb o bacilo de Koch, llamado así en honor a su descubridor (en 1882) Robert Koch, presenta una pared celular única compuesta por ácidos micólicos la cual juega un rol importante en la función celular, así como en su patogenicidad. La compleja pared celular le confiere características de extrema hidrofobicidad, resistencia a la deshidratación y a la acidez o alcalinidad y se encuentra conservada dentro del género 7.

Mtb es un patógeno obligado de humanos que pertenece al género *Mycobacterium* del filo *Actinobacteria*. Mtb se agrupa con otras especies, de crecimiento lento, causantes de enfermedades en humanos y animales, que se denomina Complejo *Mycobacterium Tuberculosis* (MTBC) 4.

Los miembros del MTBC son parientes muy cercanos y comparten un muy alto porcentaje de identidad en su secuencia nucleotídica, sin embargo se han reportado variantes asociadas con peor pronóstico y mayor gravedad 8. Uno de los avances fundamentales de las últimas décadas para la visualización de esta diversidad ha sido el desarrollo de técnicas de secuenciación de genoma completo.

El MTBC ha evolucionado entre varios linajes adaptados a humanos y linajes que se adaptaron a animales domésticos y salvajes. Los linajes adaptados a humanos son patógenos obligados y no existen reservorios animales o ambientales para estos. Los linajes L1, L2, L3, L4 y L7 pertenecen a *Mycobacterium tuberculosis* propiamente dicho y los linajes L5 y L6 a *M. africanum* (Figura 6).

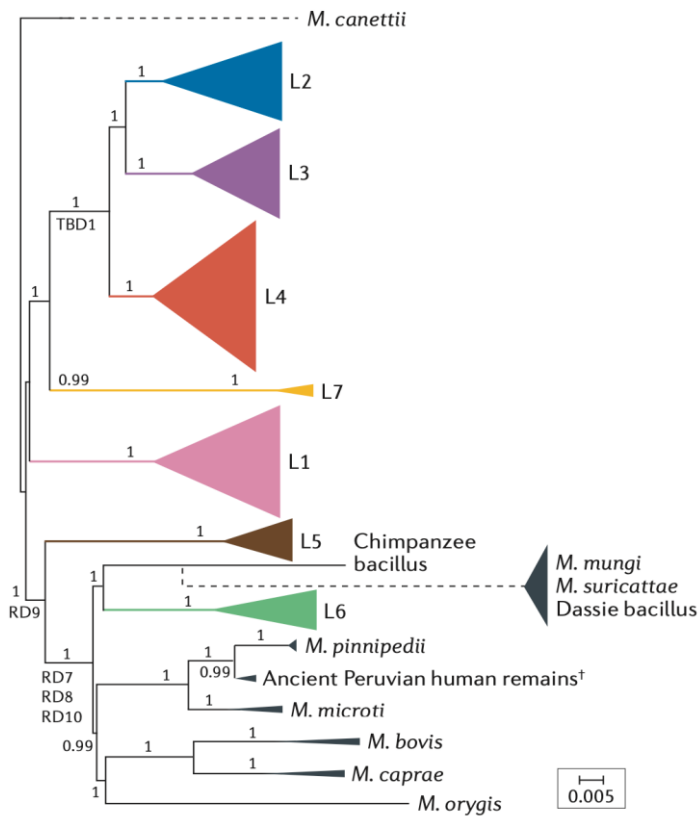


Figura 6. Árbol filogenético del MTBC. Filogenia basada en el genoma completo del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* con raíz en *Mycobacterium canettii*. Los triángulos representan una simplificación de las ramas de los principales linajes. Los linajes específicos de humanos se encuentran en color y aquellos linajes adaptados a animales en gris. El largo de la escala representa el número de sustituciones por sitio nucleotídico. Imagen tomada de ⁹.

Algunos linajes se encuentran más restringidos geográficamente que otros y se hipotetiza que estas variantes pueden estar mejor adaptadas a la población humana local ⁹. Los linajes L5 y L6 están restringidos al oeste africano mientras que L2 y L4 son los más dispersos a nivel mundial, siendo el linaje 4 el más extendido y el que se encuentra más representado en nuestro continente y que de acuerdo a trabajos de nuestro grupo es el único presente en el país ¹⁰⁻¹³. Este linaje además puede ser subdividido en múltiples sublinajes: L4.1.1 o X, L4.1.2 o Haarlem, L4.3 o LAM, L4.6.2 o Cameroon, etc. (Figura 7).

Tuberculosis: de la clínica al laboratorio y del laboratorio al paciente

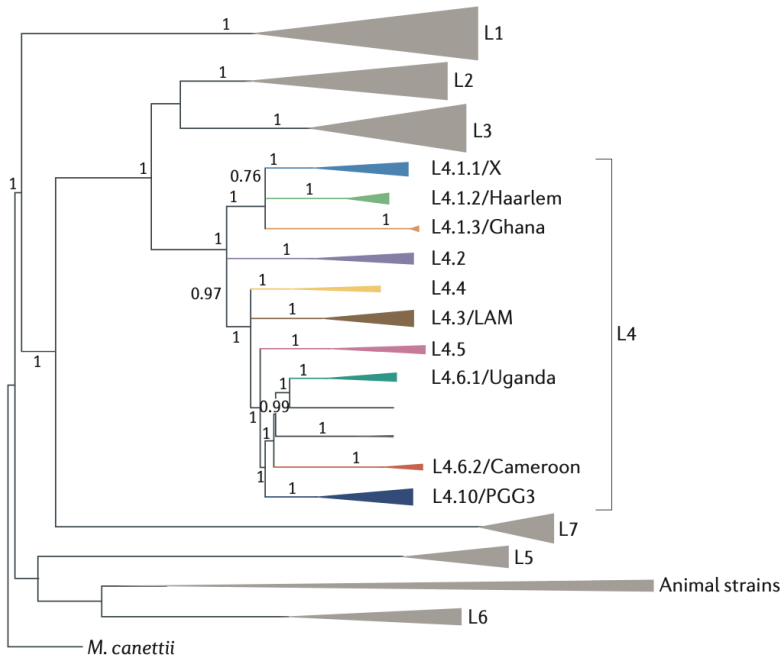


Figura 7. Árbol filogenético del Complejo de *Mycobacterium tuberculosis* con amplificación al linaje 4 que se subdivide en al menos diez sub-linajes. Imagen tomada de ⁹.

Diferentes métodos moleculares se han utilizado para identificar los principales linajes de *M. tuberculosis* y así poder establecer contactos epidemiológicos y seguimiento de brotes.

El desarrollo de las técnicas de secuenciado masivo llevó a un crecimiento exponencial de genomas completos (WGS: whole genome sequencing) y revolucionó la caracterización de la diversidad genética de miles de organismos. El uso de WGS en la caracterización de las cepas de Mtb tiene un impacto directo en la salud pública ¹⁴. Permite detectar y predecir variantes con resistencia fenotípica a antibióticos contra la tuberculosis y por lo tanto influir en las decisiones clínicas, así como también, poder realizar una vigilancia epidemiológica de los linajes circulantes y de los mecanismos de resistencia .

El avance en estas tecnologías permitió desarrollar técnicas basadas en secuenciación profunda de genes objetivo y secuenciación de todo el genoma. Ambas aproximaciones se basan en los mismos principios y equipamiento, pero de acuerdo al objetivo que se busca se puede optar por una u otra.

En el presente trabajo desarrollamos una técnica basada en secuenciación de regiones específicas de identificación de linajes y de mutaciones asociadas a resistencia a fármacos que podría permitir una caracterización global de las cepas de Mtb circulantes en el país, identificar posibles brotes, cepas resistentes y adoptar medidas a nivel de salud pública para mitigar los impactos de la enfermedad y revertir la tendencia creciente en el número de nuevos casos.

4. Tratamiento

El tratamiento de la TB requiere que sea prolongado y continuado en el tiempo para eliminar completamente los bacilos y evitar recaídas. Actualmente la clasificación de los fármacos se realiza de acuerdo a 5 grupos que se dividen según un criterio de efectividad, accesibilidad y costos de cada fármaco (Tabla 1). Siendo el Grupo 1 el más accesible y el comienzo del tratamiento para la mayoría de los pacientes.

Tabla 1. Clasificación de fármacos antituberculosos

Grupo 1	<i>Fármacos de primera línea.</i> Isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol, pirazinamida (PZ)
Grupo 2	<i>Fluoroquinolonas</i> Levofloxacin, moxifloxacin, ofloxacin
Grupo 3	<i>Inyectables</i> Estreptomycin, amikacin, kanamicin, capreomicin
Grupo 4	<i>Drogas de segunda línea de menor efectividad.</i> Cicloserin, etionamida/protionamida.
Grupo 5	<i>Drogas de efectividad menor o escasa experiencia clínica.</i> Clofazimin, linezolid, isoniacid a altas dosis, amoxiciclin-clavulánico, carbapenémicos, claritromicin

La INH es una pro-droga que difunde dentro de la bacteria y que es activada por la enzima catalasa-peroxidasa bacteriana codificada por el gen *katG*. El mecanismo de acción de INH, implica el bloqueo de la proteína transportadora *inhA* que inhibe específicamente la síntesis de ácidos micólicos¹⁵. La resistencia a esta droga suele ocurrir debido a mutaciones puntuales y altamente selectivas en el gen *katG*, pero también se observan resistencias con mutaciones en el gen *inhA*.

Por otra parte, la RIF es un bactericida que interfiere en la síntesis del ARN mensajero al unirse y bloquear la ARN polimerasa. Esta última es codificada por los genes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* y *rpoD*. Mutaciones en una región de 72 nucleótidos de la subunidad beta (codificada por el gen *rpoB*), da como resultado resistencia a rifampicina. En particular las mutaciones en este gen se concentran en una región altamente localizada entre los codones 507 a 533¹⁶.

En nuestro país, el tratamiento aconsejado para enfermos con TB que no han sido tratados previamente con drogas antituberculosas, recomienda la utilización de 4 drogas: isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol por 2 meses seguido de IZH + RIF por cuatro meses más (seis meses en total)¹⁷. Este esquema es supervisado y se realizan baciloscopías para evaluar la negativización del paciente.

Para los casos de recaídas, recuperación de enfermos que perdieron seguimiento o fracasos de tratamiento, se vuelve a iniciar el esquema anterior además de realizar test de sensibilidad a drogas. Cabe mencionar que dada la baja prevalencia de multi-resistencia (resistencia a INH y RIF) de Uruguay, se debe esperar por el test de sensibilidad y un estudio profundo de la historia clínica y bacteriológica antes de volver a iniciar el tratamiento.

5. Resistencia a fármacos

La resistencia a fármacos contra la TB es una crisis sanitaria a nivel mundial. En el año 2020 se reportaron cerca de 160000 casos resistentes a rifampicina y/o isoniazida en todo el mundo. Las cepas resistentes se pueden clasificar como cepas multidrogo-resistentes (MDR-TB) cuando presentan resistencia a rifampicina e isoniazida, que son los fármacos más utilizados o de resistencia extendida (XDR-TB) cuando, además, presentan resistencia a fármacos de segunda línea como las fluoroquinolonas, amikacina, capreomicina o kanamicina, etc. La resistencia tiene una distribución geográfica desigual, siendo mayor en aquellos países de bajos recursos económicos. La multidrogo-resistencia surge principalmente del mal uso de los fármacos anti-tuberculosis y es sabido que es más probable su transmisión entre hospederos que la aparición espontánea de nuevos casos ¹⁸.

Las tecnologías de secuenciado masivo han permitido conocer de manera muy completa las secuencias de las diferentes cepas de Mtb. En este sentido, se han descrito marcadores genotípicos de resistencia y se encuentran reportados los niveles de resistencia a determinados fármacos asociados a mutaciones puntuales. En la tabla 2 se resume a modo de ejemplo, algunas de las mutaciones con mayor grado de confianza para la asociación de resistencia fenotípica para INH y RIF. Cuando mayor el grado de confianza, más probable es que la mutación en un gen de resistencia provoque la resistencia fenotípica. Por ejemplo, una de las mutaciones más frecuentes es un cambio aminoacídico de una serina en la posición 315 por una treonina (S315T) en el gen *katG*, dando lugar a la resistencia a isoniazida, en promedio, en 64% de los casos ¹⁹. También es recurrente la mutación en la posición 15 del promotor del gen *inhA*. En conjunto estas mutaciones explican cerca del 84% de la resistencia fenotípica a la isoniazida. Del mismo modo, mutaciones en la región de los codones 507-533 del gen *rpoB* explican cerca del 96% de resistencia a rifampicina, y constituye un verdadero “hotspot” de resistencia ²⁰.

Tabla 2. Lista de mutaciones y grado de confianza asociada a resistencia fenotípica

Fármaco	Gen	Mutación	Grado de confianza	Evidencia de MIC (aislados clínicos)
INH	<i>katG</i>	S315N	Alto	0,8<MIC<12,8 mg/L ¹⁹
INH	<i>katG</i> + <i>inhA</i>	S315T y c-15t	Alto y medio alto	MIC ≥ 1 mg/L ²¹
RIF	<i>rpoB</i>	Q513K	Alto	MIC ≥ 8 mg/L ²²
RIF	<i>rpoB</i>	D516V	Alto	MIC ≥ 8 mg/L ²²

Nuevos fármacos como la bedaquilina, delamanid y linezolid se han empezado a utilizar para tratar los casos de tuberculosis resistente. Sin embargo, el acceso a estos nuevos tratamientos resulta limitado por su costo elevado y una duración de varios meses con varios fármacos que producen efectos secundarios. Por lo que, culminar el tratamiento se dificulta sobre todo en situaciones socioeconómicas desfavorables ²⁰. La búsqueda por nuevos fármacos anti-tuberculosis, así como tratamientos más efectivos y vacunas nuevas se ha intensificado en las últimas décadas en un esfuerzo para controlar la aparición de resistencia.

Además, hubo avances en cuanto a las terapias dirigidas al hospedero (HDT: host-directed therapies), que buscan aumentar la respuesta inmune y reducir o modular el proceso de inflamación, para así, de esta forma complementar la terapia con fármacos anti-tuberculosos ²³.

6. Tuberculosis en la Unidad de Cuidados Intensivos

En línea con la tendencia observada en el país, en los últimos años se evidenció una mayor cantidad de casos de tuberculosis grave que necesitan ingresar a una unidad de Cuidados intensivos. La tuberculosis en cuidados intensivos es asociada con fallas respiratorias y multiorgánicas que requieren medidas de cuidado avanzadas y en varios casos ventilación mecánica invasiva. En Uruguay la mortalidad por TB entre los pacientes admitidos en la UCI es elevada y se ubica por arriba del 50% ^{24,25}.

Para el control de la tuberculosis resulta de importancia conocer cuáles son los linajes circulantes en la población ya que las distintas familias inciden en el desarrollo clínico de la enfermedad ²⁶, en la respuesta a la vacuna y en la predisposición al surgimiento de resistencia a fármacos ^{8,27}. En este mismo sentido, se conformó un grupo interinstitucional entre el Hospital Español, el Institut Pasteur de Montevideo y la CHLA-EP para evaluar la hipótesis de que el aumento de casos graves de TB estaba asociada a un linaje específico más virulento ¹² y se realizó la tipificación de cepas causantes de estos casos de forma retro y prospectiva.

Dicho trabajo fue propuesto y financiado por la ANII al Fondo Sectorial de Salud 2018, y se genotiparon 60 aislados obtenidos de pacientes críticos en comparación con 95 aislados de la comunidad. En dicho trabajo observamos una mayor presencia de la cepa Haarlem (53,3%) en comparación con las cepas circulantes en la comunidad (34,7%), lo que podría ser indicativo de una mayor virulencia de esta cepa en particular. Sin embargo, no fue posible descartar el aporte de las comorbilidades de los pacientes graves en la mortalidad observada.

7. Marcadores moleculares en el hospedero

El mayor acceso a tecnologías de secuenciación, también permitió el acercamiento al estudio del ARN y ADN extracelular, que circula principalmente en vesículas extracelulares o formando asociación con lipoproteínas por el torrente sanguíneo ²⁸. Las vesículas extracelulares son formadas por diferentes tipos de células, especialmente bajo estrés por daño y son importantes en la comunicación celular a distancia. Asimismo, la variación en la concentración de los ARNs o ADNs circulantes en el organismo (tanto dentro de las diferentes vesículas extracelulares o formando parte de complejos con proteínas), es reflejo de estados metabólicos o procesos de enfermedad particulares. Detectar estos cambios resulta de gran importancia para la búsqueda de marcadores moleculares de enfermedad, sobre todo en muestras biológicas de fácil acceso como sangre, suero u orina.

Los microARNs (miARN) son moléculas pequeñas de ARN no codificante, de entre 18 a 24 nucleótidos de largo, que tienen un rol muy importante en la regulación post-traducciona de proteínas, pudiendo afectar diferentes procesos, como por ejemplo la respuesta inmune. Los miARNs son transcritos principalmente por la ARN polimerasa II dando lugar a un precursor

primario: pri-miARN. Este precursor es procesado por una proteína nuclear llamada Drosha, dando lugar al pre-miARN, que luego es exportado al citoplasma para nuevamente ser procesado por una proteína citoplasmática: Dicer (Figura 8).

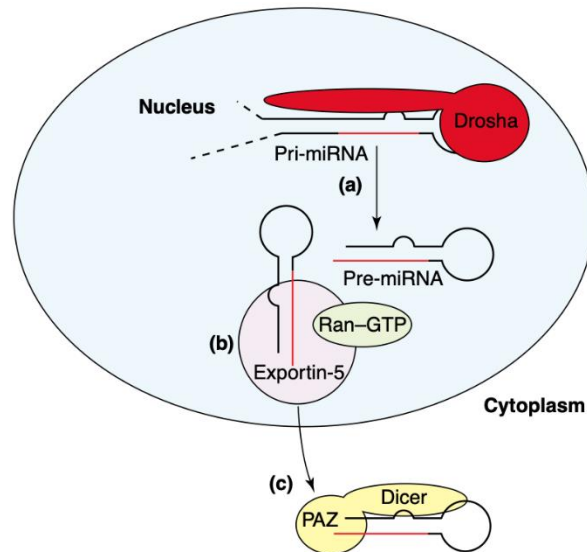


Figura 8. Modelo de la biogénesis de los miARNs. (a) los pri-miARN son transcritos en el núcleo y son procesados por Drosha dando lugar a los pre-miARN. (b) esta estructura es reconocida por una proteína de exportación del núcleo que la libera al citoplasma. (c) el precursor es cortado por Dicer que probablemente utilice el dominio PAZ que reconoce específicamente dos nucleótidos del extremo 3' y se une. Dicer corta al precursor formando el miARN maduro de ~22 nucleótidos. Imagen tomada de ²⁹.

La expresión de estos miARN responde al contexto celular. La caracterización de los miARN en contexto de enfermedad se ha utilizado para la búsqueda de firmas moleculares características de esas patologías, como importantes herramientas diagnósticas y de pronóstico. En particular para el caso de la TB, existe bibliografía de la caracterización de miARN circulantes en suero en infección y en la enfermedad, con el objetivo de realizar diagnóstico, ya que resulta en un método más rápido que el cultivo bacteriano, con el potencial de suplantar el ensayo de tuberculina o la prueba de interferón gamma, para distinguir entre TB activa y TB latente ³⁰. En ese trabajo, los autores realizan un estudio de la expresión de miARNs en suero entre individuos con tuberculosis activa, individuos con tuberculosis latente y entre controles sanos vacunados y no vacunados con BCG, observando que los distintos grupos tienen perfiles de abundancia de miARNs diferentes y logran validar el hsa-miR-196b y hsa-miR-376c como potenciales marcadores de TB activa ³¹.

Las ciencias ómicas enfocadas en la clínica de la TB estudian marcadores o firmas moleculares en fluidos o extractos biológicos, como formas de llegar a un diagnóstico precoz y más personalizado. En este trabajo realizamos la búsqueda de miARNs en suero de una población de pacientes con TB grave internados en una Unidad de Cuidados Intensivos. Para ello se realizó un análisis de abundancia diferencial contra un grupo control, como forma de identificar posibles marcadores moleculares con valor pronóstico de la enfermedad.

OBJETIVO GENERAL

Generar un método de caracterización genotípica de cepas de tuberculosis por medio de secuenciación masiva y buscar marcadores moleculares con valor diagnóstico y pronóstico en pacientes graves con tuberculosis.

El trabajo se presenta en dos grandes objetivos específicos:

1. Desarrollo de un método de secuenciación de regiones del genoma de Mtb que permite la caracterización de cepas y evaluar su perfil de resistencia a fármacos.
2. Búsqueda de marcadores moleculares (miARNs) circulantes en suero de pacientes con TB grave.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Caracterización de aislados de *Mycobacterium tuberculosis*.

a. Obtención de muestras

La obtención del ADN genómico se realizó en el marco del proyecto FMV_3_2018_1_148367: “Generación de un sistema económico de tipificación molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* y su implementación en cepas aisladas en el país”. El laboratorio Bacteriológico de la CHLA-EP, centraliza toda la bacteriología de la tuberculosis en el país y realiza los cultivos en medio Löwestein-Jensen a partir de diferentes muestras biológicas (esputo, aspirado traqueal, lavados broncoalveolares, etc). De los cultivos positivos se extrae el ADN mediante métodos estandarizados con el kit Genolyse (HAIN, Alemania) y se conserva a -20 °C en el Biobanco de la CHLA-EP.

Se obtuvieron 49 ADNs provenientes de aislados del sistema penitenciario que fueron diagnosticados con tuberculosis durante el año 2019 (Tabla 3). El diagnóstico de TB pulmonar se realizó ante la evidencia de un cuadro clínico y radiológico y posteriormente confirmación por cultivo bacteriano.

Tabla 3. ADN bacteriano aislado de personas privadas de libertad. El resultado de la baciloscopía se informa como negativo si no existe la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en 100 campos. Se considera positivo <20 cuando se observan entre 1 a 9 BAAR/100 campos, positivo + entre 10 y 99 BAAR/100 campos, positivo ++ entre 1 a 10 BAAR/campo y positivo +++ 10 BAAR/campo. En la columna Recaída se indica con un 1 si la persona fue previamente tratada con cura clínica y vuelve a infectarse.

ID	Procedencia	F. nac.	Sexo	Departamento	Baciloscopía	Recaída
1	Cárcel Central	07/05/1994	M	Montevideo	Positivo ++	0
2	Punta de Rieles	18/09/1991	M	Montevideo	Positivo ++	-
3	Cárcel Central	27/04/1999	M	Paysandú	Positivo +	0
4	Cárcel Central	09/06/1987	M	Montevideo	Positivo ++	-
5	Cárcel Central	30/11/1984	M	Montevideo	Positivo <20	0
6	CP Durazno	21/07/1976	F	Durazno	Positivo <20	0
7	Cárcel Central	06/08/1959	M	Montevideo	Positivo +++	0
8	Cárcel Central	14/07/1995	M	Montevideo	Positivo ++	0
9	Cárcel Central	14/09/1996	M	Montevideo	Positivo +	0
10	Cárcel Central	21/05/1973	M	Montevideo	Positivo <20	0
11	Cárcel Central	17/10/1965	M	Montevideo	Positivo +	0
12	Cárcel Central	14/12/1986	M	Montevideo	Positivo <20	0
13	Punta de Rieles	08/12/1992	M	Montevideo	Positivo +++	0
14	Santiago Vázquez	15/09/1993	M	Montevideo	Positivo <20	0
15	Cárcel Central	25/07/1993	M	Montevideo	Positivo ++	0
16	Cárcel Central	21/07/1989	M	Montevideo	Positivo +	-
17	Cárcel Central	18/02/1997	M	Montevideo	Positivo <20	0
18	Cárcel Central	22/07/1991	M	Montevideo	Positivo +++	0
19	Cárcel Central	28/06/1979	M	Montevideo	Positivo <20	0
20	Cárcel Central	14/12/1980	M	Montevideo	Positivo <20	0
21	Cárcel Central	01/04/1946	M	Montevideo	Positivo <20	1

22	Cárcel Central	30/07/1982	M	Montevideo	Positivo +	0
23	CNR - Centro	28/07/1994	F	Montevideo	Positivo <20	0
24	CNR - Centro	08/10/1971	F	Montevideo	Positivo <20	-
25	Punta de Rieles	28/04/1998	M	Montevideo	Positivo +++	0
26	Cárcel Central	04/04/1976	M	Canelones	Positivo <20	0
27	Cárcel Central	30/01/1973	M	Montevideo	Positivo +++	0
28	Santiago Vázquez	01/01/1995	M	Montevideo	Positivo ++	0
29	Cárcel Central	24/07/1994	M	Montevideo	Positivo +	0
30	Cárcel Central	12/07/1978	M	Montevideo	Positivo <20	0
31	Canelones - U	22/01/1987	M	Montevideo	Positivo <20	1
32	CNR - Centro	10/07/1988	F	Montevideo	Positivo ++	0
33	Canelones - U	27/03/1992	M	Canelones	Positivo +	0
34	Punta de Rieles	09/01/1989	M	Montevideo	Positivo <20	-
35	Cárcel Central	02/03/1996	M	Montevideo	Positivo +++	0
36	Cárcel Central	28/11/1984	M	Montevideo	Positivo +++	0
37	Punta de Rieles	20/01/1985	M	Montevideo	Positivo <20	0
38	Punta de Rieles	05/04/1981	M	Montevideo	Positivo +++	1
39	Cárcel Central	13/12/1990	M		Positivo <20	0
40	Cárcel Central	17/06/1983	M	Montevideo	Positivo +++	0
41	Canelones - U	29/07/2000	M	Canelones	Positivo <20	0
42	Cárcel Central	05/02/1990	M	Montevideo	Positivo <20	0
43	Cárcel Central	10/06/1978	M	Montevideo	Positivo <20	0
44	Punta de Rieles	01/06/1987	M	Montevideo	Positivo +++	0
45	Santiago Vázquez	04/08/1984	M	Montevideo	Positivo +	0
46	Santiago Vázquez	01/02/1988	M	Montevideo	Positivo <20	1
47	Cárcel Central	19/06/1980	M	Montevideo	Positivo <20	0

b. Selección de genes para tipificación de cepas y búsqueda resistencia

La tipificación de cepas se llevó adelante mediante la búsqueda de polimorfismos de nucleótido simple para clasificar linajes. Estos SNPs se encuentran reportados en la bibliografía y permiten discriminar cepas circulantes conocidas³². En la tabla 4 se describen los polimorfismos asociados a los principales linajes. El diseño de cebadores se realizó de modo de obtener amplicones de entre 200 y 700 nucleótidos que incluyen en la zona central el SNP que se desea identificar.

Tuberculosis: de la clínica al laboratorio y del laboratorio al paciente

Tabla 4. Polimorfismos asociados a genes para discriminar linaje. En la tabla se indica el linaje, el nombre o denominación que recibe, el gen y la posición de la mutación respecto al genoma de referencia. Además, se indica el cambio de base, el número de codón donde ocurre. Todas son sustituciones silenciosas por lo que no hay cambio de aminoácido.

<i>Linaje</i>	<i>Nombre sublinaje</i>	<i>Gen</i>	<i>Posición*</i>	<i>Cambio alelo</i>	<i>Número de codón</i>	<i>Cambio de codón</i>
Linaje 1	Linaje 1	hemL	615938	G/A	368	GAG/GAA
Linaje 2	Linaje 2	glnH	497491	G/A	270	GAC/GAT
Linaje 3	Linaje 3	drpA	3273107	C/A	298	GCC/GCA
Linaje 4	Linaje 4	lpqQ	931123	T/C	57	TAT/TAC
Linaje 4.1.1	X	ctpH	514245	C/T	359	GTG/GTA
Linaje 4.1.2.1	Haarlem	fcoT	107794	C/T	65	GCC/GCT
Linaje 4.3	LAM	rpoC	764995	C/G	542	GCC/GCG
Linaje 4.4.1.1	S	mycP3	355181	G/A	228	AAG/AAA
Linaje 5	Linaje 5	hisD	1799921	C/A	113	GGC/GGA
Linaje 6	Linaje 6	pykA	1816587	C/G	133	GTC/GTG
Linaje 7	Linaje 7	glmU	1137518	G/A	181	AAC/AAT

*De acuerdo al genoma de referencia NC_000962.3

Asimismo se realizó el diseño de cebadores para determinar la secuencia de genes dónde se reportaron mutaciones asociadas con resistencia a fármacos antituberculosis de primera y segunda línea. En la tabla 5, se especifican nueve genes de interés asociados a resistencia.

Tabla 5. Genes asociados a resistencia a fármacos anti-tuberculosos. Se describen los genes más asociados a resistencia fenotípica contra los principales fármacos antituberculosos y la posición de cada gen respecto al genoma de referencia de *M. tuberculosis*.

<i>Resistencia asociada</i>	<i>Gen</i>	<i>Posición*</i>
Kanamicina	eis	2714124-2715332
Ethambutol	embB	4246514-4249810
Fluoroquinolonas	gyrA	7302-9818
Fluoroquinolonas	gyrB	5240-7267
Isoniazida	inhA	1674202-1675011
Isoniazida	katG	2153889-2156111
Pirazinamida	pncA	2288681-2289241
Rifampicina	rpoB	759807-763325
Estreptomina	rrS	1471846-1473382

*De acuerdo al genoma de referencia NC_000962.3

Anteriormente nuestro grupo clasificó mediante MIRU-VNTR y Spoligotyping una población de pacientes con TB internados en UCI, así como casos comunitarios que no requirieron internación¹². Algunas de estas cepas ya caracterizadas, junto con cepas de referencia proporcionadas por la CHLA-EP fueron utilizadas como pruebas de concepto.

c. Amplificación en múltiplex

Para el diseño de los cebadores se utilizaron herramientas informáticas disponibles en la web como PrimerPooler³³. Posteriormente se verificó la formación de dímeros y heterodímeros tomando en cuenta la posibilidad de realizar varias amplificaciones en una misma reacción, con herramientas online como las que se encuentran en “Integrated DNA Technologies” (www.idt-dna.com).

Se realizó el chequeo de todos los amplicones de forma independiente, posteriormente se determinaron todos los parámetros necesarios para la amplificación en conjunto. Finalmente, se puso a punto la concentración de cada cebador para conformar el pool de linaje (pool-L) y el pool de resistencia (pool-R).

d. Secuenciación de amplicones

A partir de los amplicones generados con la PCR, se construyeron las bibliotecas de secuenciación compatibles con la plataforma MiSeq (Illumina, USA) utilizando el kit “Nextera XT DNA library Prep” (Illumina) para la generación de bibliotecas siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó un kit de 2x75 ciclos compatible con el equipo MiSeq de Illumina, disponible en el Institut Pasteur de Montevideo. Se realizó la secuenciación por ambos extremos (Paired-End).

e. Análisis bioinformáticos

Desarrollamos un esquema de análisis propio, concatenando programas en línea de comandos con el objetivo de identificar polimorfismo de nucleótido simple (SNPs por sus siglas en inglés) para clasificar linaje y resistencia (Figura 9). En primer lugar, se realizó un chequeo de la calidad de los archivos de salida o lecturas en formato fastQ¹ y se recortaron los extremos con calidades menores a 30 y las secuencias de adaptadores con el programa Sickle³⁴.

¹ Archivo de texto conteniendo la secuencia nucleotídica y su correspondiente calidad (Phred score)

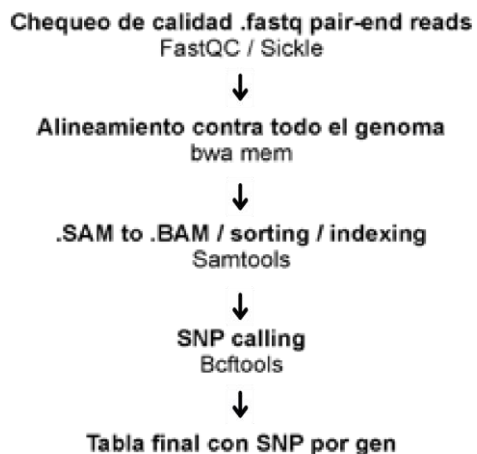


Figura 9. Esquema de trabajo para el análisis informático de las secuencias obtenidas. Se realiza un control de calidad y recorte de adaptadores y cebadores. Luego se realiza el alineamiento contra todo el genoma. Las lecturas que mapean se procesan con herramientas del paquete samtools para obtener una tabla que compila los SNPs detectados en cada gen.

A partir de los archivos de salida de estos alineadores de secuencia, se utilizó bcftools mpileup para generar una tabla de datos con los polimorfismos detectados en cada gen o región comparando contra el genoma de referencia (H37Rv – NC_000962.3) (Figura 15). A modo de chequeo de este flujo de trabajo, también se comparó con programas online disponibles para realizar este análisis como PhyResSE³⁵, que brindan informes de tipificación y de resistencia a partir de archivos de secuenciación genómica.

2. Búsqueda de marcadores moleculares con valor pronóstico de TB severa

a. Población de estudio

Para la búsqueda de marcadores moleculares en el hospedero, se obtuvo suero de una población de pacientes ingresados en la UCI del Hospital Español-ASSE, que fueron diagnosticados en base a un cuadro clínico/radiológico compatible, y con confirmación bacteriológica, para TB (Tabla 6). Dichos sueros fueron recolectados entre 2016 y 2020 en el marco del proyecto ANII FSS_X_2016_1_127692 y cuenta con aval del Comité de Ética del Hospital Español. Se tomaron muestras de sangre en el primer día de ingreso a la UCI, previo a la administración de antibióticos. A partir de la centrifugación de la sangre, se obtuvo el suero. En total, se obtuvieron 32 sueros que fueron almacenados a -80 °C hasta su procesamiento.

Tabla 6. Datos generales y principales características de pacientes con TB grave. En la tabla se indica la edad del paciente, sexo, puntuación en el sistema de clasificación de severidad (APACHE II: Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II) y desenlace (V: vive, F: fallece). También se indican los días de ventilación mecánica requeridos, fecha de ingreso en la UCI, total de días dentro de la Unidad y si era positivo para VIH.

<i>ID</i>	<i>Edad</i>	<i>Sexo</i>	<i>APACHE II</i>	<i>Desenlace</i>	<i>V. mec. (días)</i>	<i>Ingreso UCI</i>	<i>Días en UCI</i>	<i>VIH</i>
175-6	34	F	29	F	35	8/8/17	35	0
224-6	29	F	13	V	0	27/5/17	6	1
397-7	59	F	37	F	2	27/2/17	2	0
522-0	33	M	43	F	15	11/8/17	16	1
707-6	38	M	27	F	6	23/11/16	6	0
761-6	32	M	21	F	7	10/5/17	7	0
STB04	51	M	24	F	4	14/4/20	4	0
STB05	32	F	8	V	0	14/2/17	2	1
STB06	42	M	-	V	0	13/6/18	1	0
STB09	48	M	22	F	20	8/11/17	28	0
STB10	44	M	4	V	0	17/4/18	8	0
STB11	37	F	12	V	2	6/12/17	4	0
STB12	56	M	12	V	-	19/1/18	5	1
STB14	27	F	11	V	0	8/10/18	10	0
STB15	78	M	19	F	2	16/9/18	2	0
STB16	48	M	27	F	25	19/5/18	25	0
STB18	47	M	42	F	3	19/2/19	3	1
STB20	57	M	24	V	30	9/3/18	48	0
STB21	38	F	31	F	23	10/1/19	28	1
STB22	62	M	35	F	25	13/3/19	29	0
STB23	34	M	25	F	5	28/5/19	5	0
STB24	29	F	20	F	2	23/12/18	7	0
STB25	33	F	19	V	8	18/7/19	11	0
STB03	26	F	11	F	1	12/7/17	1	1
STB32	71	M	-	F	1	24/11/18	1	1
STB33	23	M	26	V	19	8/9/17	22	0
STB34	41	M	9	V	0	6/10/18	9	0
STB35	24	M	18	V	8	11/9/19	14	0
STB36	40	M	8	F	1	8/6/20	2	0
STB37	29	M	12	V	-	26/7/20	10	0
STB38	49	M	10	V	-	3/7/20	6	0
STB39	27	M	22	F	5	13/2/20	5	0

Tuberculosis: de la clínica al laboratorio y del laboratorio al paciente

Se destacan varias comorbilidades en común a todos ellos como policonsumo y situación de calle (44%), abandonos de tratamiento (31%), fumadores o ex fumadores intensos (28%), VIH positivo (22%) y privados de libertad o ex privados de libertad (12%).

Como población control se utilizaron sueros normales de donantes anónimos que tenían las siguientes características: entre 18 a 65 años, más de 50 kg de peso, buen estado de salud, sin historial de enfermedades infecciosas y con pruebas negativas para VIH, virus de la hepatitis (tipo B o C), enfermedad de Chagas, así como pruebas bacteriológicas negativas para hanseniasis (lepra), brucelosis, sífilis y tuberculosis.

b. Extracción de ARN

Se realizó la extracción de ARN total (incluidos los miARNs) a partir de suero, con el kit “Quick-cfRNA Serum and Plasma” (ZYMO Research, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para todos los casos se partió de 1 mL de suero. En el caso que la muestra se encontrara con signos de hemólisis, se realizó una centrifugación previa de 15 minutos a 10.000 g a 4°C.

c. Secuenciación de ARNs pequeños circulantes en suero

Se fabricaron bibliotecas para secuenciar los ARNs circulantes en suero con la plataforma MiSeq (Illumina, USA) utilizando el kit “NEBNext small RNA Library Prep Set for Illumina” (New England Biolabs, USA). Las bibliotecas se cuantificaron con el kit Qubit “High Sensitivity dsDNA Assay”. Se realizó una secuenciación de 50 ciclos con el cartucho “MiSeq Reagent Kit v3”, en el secuenciador MiSeq disponible en el Institut Pasteur de Montevideo.

d. Análisis de datos

Las secuencias obtenidas se analizaron con el paquete de programas disponible online sRNAtoolbox (<http://bioinfo5.ugr.es/srnatoolbox>). Se utilizaron principalmente dos programas de este paquete. En primer lugar, el paquete sRNAbench³⁶ se utilizó para observar el perfil de abundancia de ARNs pequeños de cada muestra. En segundo lugar, se utilizó el paquete sRNAdiff que permite la detección de ARNs pequeños diferencialmente abundantes entre grupo de muestras. Además, se utilizan otros paquetes como DESeq2³⁷ para la normalización y el análisis diferencial, calculando el valor de cambio y la dispersión de estos datos, lo que permite analizar expresión o abundancia diferencial entre grupos. Las tablas finales de resultados indican el p-valor ajustado. En nuestro análisis, un p-valor ajustado <0,05 fue considerado un cambio significativo.

e. Validación de miARNs

La validación de los miARNs se realizó mediante la amplificación por la técnica de stem-loop RT-qPCR³⁸(Chen et al., 2005) y el análisis de las abundancias relativas por el método del $\Delta\Delta C_t$ ³⁹.

En base a la información obtenida en el análisis de abundancia diferencial, los miARNs con un p-valor ajustado significativo, que presentaran un número de lecturas alta (o sea de mayor abundancia) se propusieron como candidatos a marcadores de enfermedad o como pronóstico de gravedad.

RESULTADOS

1. *Desarrollo de un método de secuenciación de regiones del genoma de Mtb que permite la caracterización de cepas y evaluar su perfil de resistencia a fármacos.*

Como caso de estudio y por ser una población de interés, se seleccionaron del banco de ADN de la CHLA-EP, cepas de personas privadas libertad obtenidas en el año 2019. Se realizó la amplificación y secuenciación de las regiones seleccionadas que por un lado permiten determinar el linaje y sublinaje del aislado y por otro evidenciar la presencia (si la hubiera) de mutaciones asociadas a resistencia a fármacos anti-tuberculosis.

A partir de las secuencias obtenidas y con el algoritmo de análisis bioinformático utilizado se obtuvo información de este grupo particular de cepas. Brevemente, a partir de los archivos de salida del alineamiento, se realizó la visualización del mapeo de las secuencias con el programa IGV (Integrative Genomic Viewer), y se identificaron las variantes en las coordenadas reportadas en la bibliografía (Figura 10). Además, con la herramienta informática *bcftools* se identificaron los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) respecto al genoma de referencia (genoma de la cepa H37Rv), y se consideró un SNP si existía un cambio reportado en las posiciones mencionadas y tenía una cobertura de al menos 5 secuencias para esa posición (Tabla 7).

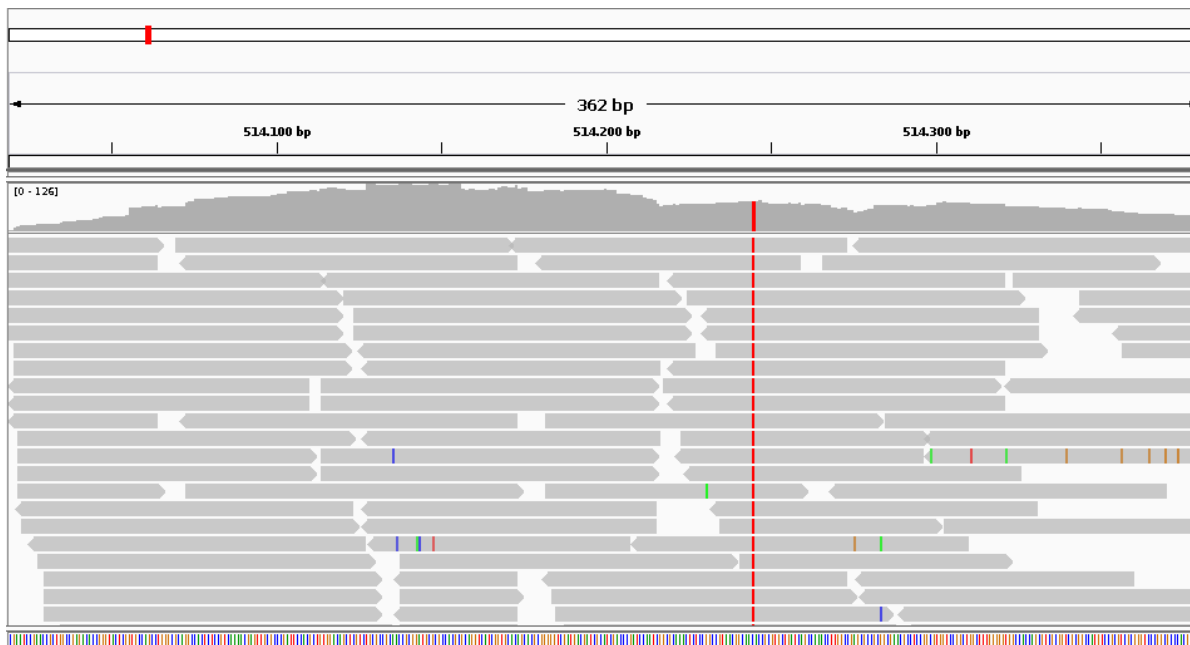


Figura 10. Visualización de los alineamientos con el programa IGV para la identificación del linaje X. En el ejemplo se observa la región correspondiente al gen *ctpH* para una muestra. Se identifican las secuencias alineadas al genoma en gris, la cobertura debajo de la línea de referencia y el cambio de nucleótido en rojo (C/T) identificado en la posición 514245 del genoma de referencia.

Tabla 7. Resumen de los polimorfismos detectados por bcftools (en formato VCF). En este caso se indican los resultados de dos muestras a modo de ejemplo, donde se indica la posición del polimorfismo, la base de la referencia y la alteración detectada, seguido de la puntuación de calidad de Phred-escalada (cuanto mayor es, mayor es la confianza para esa alteración).

	<i>Posición</i>	<i>Ref</i>	<i>Alt</i>	<i>Calidad</i>
17_sorted_aln_genoma.bam				
M. tuberculosis NC_000962.3	7362	G	C	159
M. tuberculosis NC_000962.3	7585	G	C	171
M. tuberculosis NC_000962.3	9304	G	A	201
M. tuberculosis NC_000962.3	760115	C	T	225
18_sorted_aln_genoma.bam				
M. tuberculosis NC_000962.3	7362	G	C	148
M. tuberculosis NC_000962.3	7585	G	C	225
M. tuberculosis NC_000962.3	9304	G	A	183
M. tuberculosis NC_000962.3	2289017	A	G	225

En base a los resultados anteriores, se resumen en la tabla 8 la asignación de linaje para cada una de las muestras. Para los aislados 12, 14, 33 y 34 en los que no hubo secuencias o la cobertura fue muy baja para evidenciar polimorfismos, se clasificaron los linajes mediante MIRU-VNTR.

Tabla 8. Clasificación de las cepas aisladas del sistema penitenciario. Se indican las secuencias en todo el pool-L, la cobertura que tuvo el mismo y la clasificación que surge como resultado de observar la presencia de los polimorfismos en las posiciones de los genes seleccionados.

<i>ID</i>	<i>Secuencias en pool L</i>	<i>Cobertura en pool L</i>	<i>Clasificación de linajes</i>
1	2860	104	LAM
2	47075	1713	LAM
3	8703	317	X
4	5175	188	LAM
5	9578	348	Haarlem
6	2630	96	X
7	222113	8081	X
8	-	-	-
9	57814	2103	Haarlem
10	5148	187	X
11	95368	3470	LAM
12	5575	203	LAM
13	8321	303	Haarlem
14	10959	399	LAM
15	56365	2051	X
16	3944	143	Haarlem
17	11343	413	Haarlem
18	7713	281	X
19	54529	1984	Haarlem
20	7721	281	X
21	5143	187	Haarlem
22	9895	360	S
24	21198	771	X
25	4837	176	LAM
26	10097	367	X
27	176934	6437	-
28	396169	14413	Haarlem
29	4899	178	X
30	25152	915	X
31	15299	557	LAM
32	12192	444	LAM
33	4211	153	LAM
34	14470	526	LAM
35	7458	271	LAM
36	9505	346	Haarlem
37	2261	82	X
38	642	23	X
39	42855	1559	LAM
40	15257	555	X
41	2431	88	-
42	10493	382	Haarlem
43	6420	234	LAM
44	8517	310	LAM
45	4586	167	LAM
46	2722	99	X
47	32983	1200	X

Los resultados obtenidos indican que dentro del sistema penitenciario (SP) se detectaron 39% de cepas LAM (linaje 4.3), 34% de cepas X (linaje 4.1.1), 25% Haarlem (linaje 4.1.2.1) y 2% S (linaje 4.4.1.1) (Figura 11). La distribución de los linajes aislados del SP contrasta con la observada en los aislamientos de la comunidad. En particular, la cepa X se encuentra sobrerrepresentada en el SP (chi-cuadrado con p-valor = 0,0001). Este linaje no fue detectado en ninguno de los aislados de pacientes internados en cuidados intensivos, y es detectado en muy bajo porcentaje en aislados de la comunidad (entorno al 1%)¹². Tampoco fue observada en cepas resistentes caracterizadas por nuestro grupo previamente¹¹.

Tuberculosis: de la clínica al laboratorio y del laboratorio al paciente

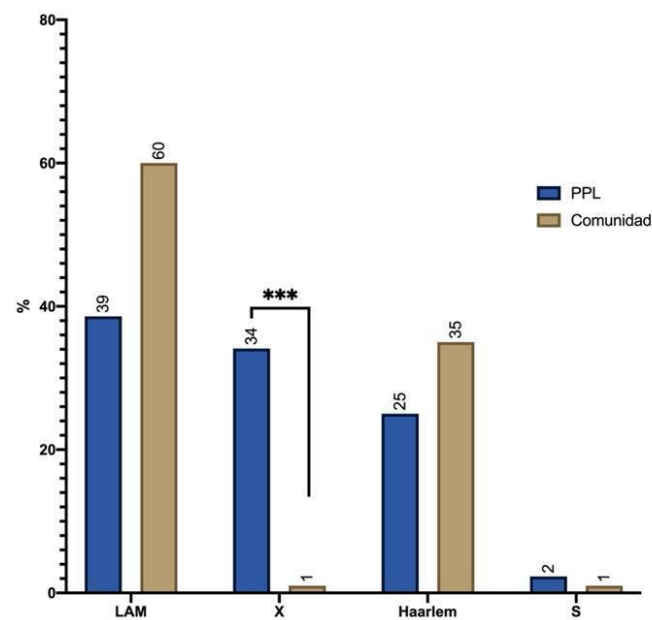


Figura 11. Porcentaje de linajes en población de personas privadas de libertad (azul) vs linajes circulantes en la comunidad (beige).

Cuando se observa el origen de la población de estudio, 28 corresponden a casos aislados de personas que fueron detectados al ingreso del SP en el área metropolitana, 25 de estas personas ya tenían ingresos previos al SP y solamente 3 fueron ingresos sin antecedentes. Para estos últimos, las cepas aisladas fueron identificadas como LAM o Haarlem, que son los linajes que más circulan en la comunidad. Por el contrario, los aislados tipificados como linaje X fueron obtenidos de personas dentro del SP o de personas que re-ingresaban al sistema. Los 19 aislados restantes corresponden a la identificación de casos en base a consultas médicas compatibles con cuadro clínico que ya se encontraban dentro del SP. También el linaje X fue hallado en más de un 30% de estos aislados.

A modo de comparación, se realizó un análisis de tipificación de cepas utilizando el software online PhyResSE ³⁵ (<https://bioinf.fz-borstel.de/mchips/phyresse/>). En dicho programa se cargaron las corridas obtenidas del MiSeq y como resultados se pudieron clasificar 23 cepas. Las restantes no tuvieron suficientes lecturas para ser procesadas por este programa, aunque fueron asignadas al linaje 4 (sin identificar el sublinaje). Solamente en un caso (muestra 26) la tipificación no coincidió con nuestra metodología propuesta (Tabla 9).

Tabla 9. Comparación de las clasificaciones obtenidas mediante la estrategia desarrollada en este trabajo y mediante el paquete PhyResSE. Se indica la clasificación asignada por cada metodología. En la columna de MIRU-VNTR solamente se tipificaron aquellas que no pudieron ser clasificadas. El recuadro en rojo indica la única discrepancia entre el análisis informático hecho por nuestro grupo y PhyResSE, la tipificación de este aislado por MIRU resultó del linaje Haarlem.

<i>ID</i>	<i>Análisis informático</i>	<i>PhyResse</i>	<i>MIRU-VNTR</i>	<i>ID</i>	<i>Análisis informático</i>	<i>PhyResse</i>	<i>MIRU-VNTR</i>
1	LAM	LAM		24	X		
2	LAM	LAM		25	LAM	LAM	
3	X	X		26	Haarlem	X	Haarlem
4	LAM	LAM		27	-		
5	Haarlem			28	Haarlem	Haarlem	
6	X	X		29	X		
7	X	X		30	X		
8	-			31	LAM	LAM	
9	Haarlem			32	LAM	LAM	
10	X	X		33			LAM
11	LAM	LAM		34			LAM
12			LAM	35	LAM	LAM	
13	Haarlem			36	Haarlem		
14			LAM	37	X		
15	X	X		38	X	X	
16	Haarlem			39	LAM	LAM	
17	Haarlem			40	X		
18	X			41	-		
19	Haarlem			42	Haarlem		
20	X			43	LAM	LAM	
21	Haarlem			44	LAM	LAM	
22	S	S		45	LAM	LAM	
23	LAM	LAM		46	X		
				47	X	X	

Tuberculosis: de la clínica al laboratorio y del laboratorio al paciente

Para la búsqueda de mutaciones asociadas a resistencia a fármacos, se utilizó el mismo esquema de trabajo que la parte anterior, acotando la búsqueda a los genes asociados a resistencia a fármacos seleccionados. En la tabla 10, se resumen todos los polimorfismos detectados para cada una de las muestras. Solamente en 4 aislados no se pudo obtener lecturas y no se pudo realizar el análisis para la búsqueda de polimorfismos de resistencia.

Tabla 10. Búsqueda de SNPs en genes de resistencia. Se indica el gen, la posición del cambio de SNP y cuantos aislados presentaron esa sustitución. Además, se indica el cambio de codón (en negrita la base que se modifica), el cambio de aminoácido y si el mismo se encuentra reportado en la literatura asociado a resistencia.

<i>Gen</i>	<i>Posición 1</i>	<i>N.º de muestras</i>	<i>Cambio de SNP</i>	<i>Cambio codón</i>	<i>Cambio de AA²</i>	<i>Bibliografía</i>
gyrA	7362	30	G/C	GAG/CAG	Glu62Gln	No reportado
gyrA	7585	28	G/C	AGC/ACC	Ser95Thr	No reportado
gyrA	8040	4	G/A	GGC/AGC	Gly247Ser	No reportado
gyrA	9304	27	G/A	GGC/GAC	Gly668Asp	No reportado
gyrB	6438	1	C/G	CCC/CGC	Pro400Arg	No reportado
gyrB	6034	1	C/T	AAC/AAT	Asn265Asn	No reportado
katG	2154279	2	G/A	CTC/CTT	Leu611Leu	No reportado
katG	2154015	1	C/G	GGG/GGC	Gly699Gly	No reportado
pncA	2289017	17	A/G	GGT/GGC	Gly75Gly	No reportado
rpoB	760106	2	G/A	TCG/TCA	Ser100Ser	No reportado
rpoB	760115	10	C/T	GAC/GAT	Asp103Asp	No reportado
rpoB	760629	1	C/G	CTG/GTG	Leu275Val	No reportado
rpoB	760852	1	T/C	ATG/ACG	Met349Thr	No reportado
rrS	1472337	3	C/T	ribosomal	c492t	Estreptomina ⁴⁰
rrS	1473314	4	A/C	ribosomal	a1469c	No reportado

¹ Respecto al genoma de referencia *Mycobacterium tuberculosis* (NC_000962.3)

² Respecto a la posición en el gen

La mayoría de las mutaciones producen cambios sinónimos de aminoácidos (57%). En tres aislados se detectó la mutación c1472337t en el gen *rrS* que codifica para la subunidad ribosomal 16S. La mutación está asociada a resistencia a estreptomina, aunque no está caracterizada como SNP de alta confianza. Para el resto de los aislados, en donde hubo un cambio aminoacídico, no se encontró evidencia bibliográfica que indique resistencia fenotípica y es coincidente con la información de estudios de sensibilidad realizados previamente por la CHLA-EP y con la respuesta clínico bacteriológica que tuvieron los PPL.

A modo de corroborar estos resultados, se realizó un análisis con PhyResSE donde se obtuvo una tabla que indica todas las mutaciones observadas por muestra, y si esas mutaciones se encuentran reportadas en la bibliografía. Las secuencias ingresadas al programa contenían una alta tasa de repetición que fueron identificadas como contaminaciones, y en algunos casos no se pudieron alinear contra la referencia. Del total, se pudo obtener información de 38 aislados. En la tabla 11 se resumen solamente aquellas que tuvieran una mayor cobertura.

Tabla 11. Mutaciones asociadas a resistencia encontradas por el programa PhyResSE. Para un subset de muestras se indica la posición y la mutación respecto a la referencia. También se indica un score de calidad, la región donde ocurre y el cambio de aminoácido y si la variante está asociada a resistencia fenotípica. Todas las mutaciones fueron encontradas en nuestro análisis anterior.

<i>ID</i>	<i>Posición</i>	<i>Ref</i>	<i>Muestra</i>	<i>Calidad</i>	<i>Región</i>	<i>Cambio AA</i>	<i>Variante conocida</i>
32	1472337	C	T	7567,77	Rvnr01	rRNA	estreptomicina
45	1472337	C	T	6624,77	Rvnr01	rRNA	estreptomicina
1	1472337	C	T	2969,77	Rvnr01	rRNA	estreptomicina
1	7585	G	C	8770,77	Rv0006 (gyrA)	Ser95Thr	Genotípica
40	7585	G	C	3550,77	Rv0006 (gyrA)	Ser95Thr	Genotípica
47	7585	G	C	3138,77	Rv0006 (gyrA)	Ser95Thr	Genotípica
28	7585	G	C	2912,77	Rv0006 (gyrA)	Ser95Thr	Genotípica
38	7585	G	C	2660,77	Rv0006 (gyrA)	Ser95Thr	Genotípica
22	7585	G	C	2157,77	Rv0006 (gyrA)	Ser95Thr	Genotípica
13	7585	G	C	2083,77	Rv0006 (gyrA)	Ser95Thr	Genotípica

PhyResse también encontró las mismas mutaciones dentro de las muestras analizadas. Tres muestras presentaron la mutación en el gen *rrS* (posición 1472337) y se les asignó resistencia fenotípica a estreptomicina³². En el resto de los casos se encontró la variante g7585c en el gen *gyrA*, que no está asociado hasta ahora, a resistencia fenotípica.

2. *Búsqueda de marcadores moleculares (miARNs) circulantes en suero de pacientes con TB grave.*

A partir de suero de pacientes obtenidos al ingreso a la UCI del Hospital Español y suero de donantes sin antecedentes de tuberculosis ni otras enfermedades conocidas, se realizó la secuenciación de miARNs circulantes.

Se comparó la abundancia diferencial de los miARNs obtenidos comparando los pacientes con TB grave y los controles. En primer lugar, se realizó un mapa de calor que permite identificar datos atípicos o por fuera de la media (Figura 12). El agrupamiento de las muestras, según el perfil de abundancia diferencial de miARNs, logra clasificar las muestras según el grupo al que pertenecen.

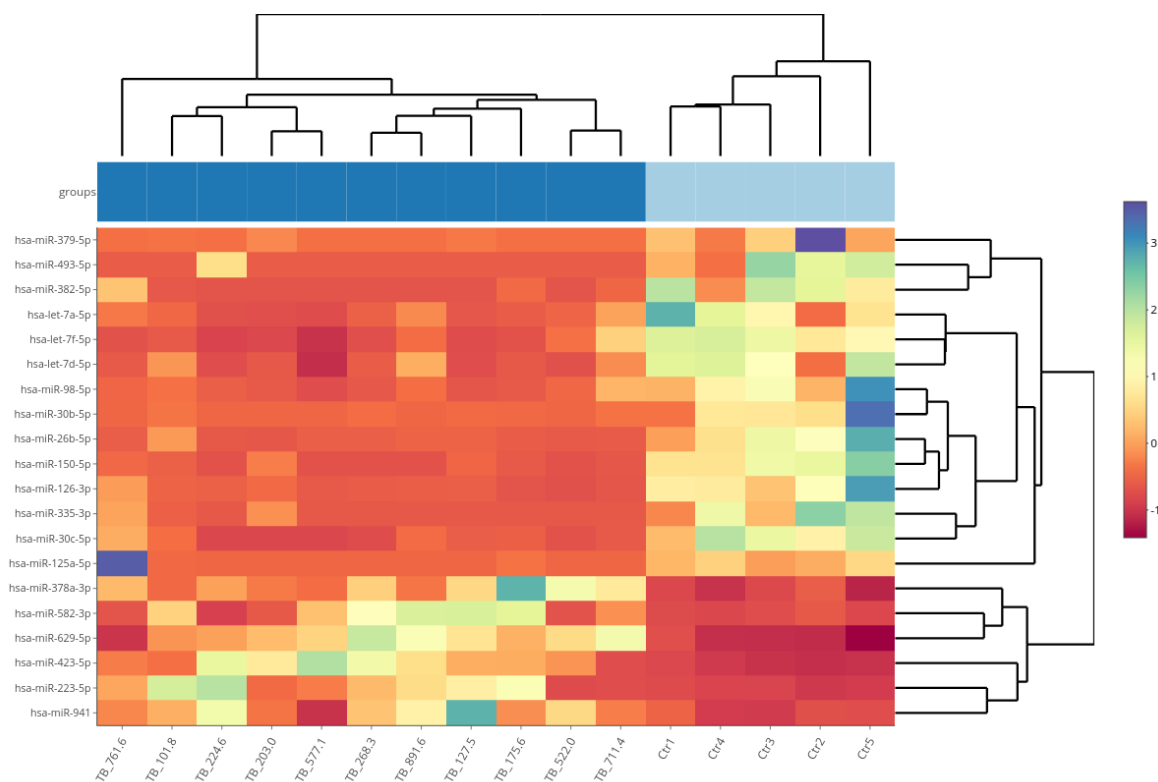


Figura 12. Mapa de calor de abundancia diferencial de miARNs en suero. Se grafican los 20 miARNs con el p-valor más bajo diferencial entre pacientes con TB (indicado con azul oscuro en la barra superior) vs muestras del grupo control (indicados en celeste). La barra de color indica la abundancia diferencial de cada miARN por muestra.

En segundo lugar, la abundancia diferencial de miARNs se calculó por medio de DESeq2. La normalización realizada por DESeq2 es utilizada para eliminar el efecto de diferente número de secuencias por muestras, o sea, que diferencias entre muestras no se deban a la profundidad de secuenciado. Los valores de conteo para cada miARN se dividen por un factor de escala que toma en cuenta el logaritmo en base e del total de lecturas para cada muestra. A partir de este análisis se seleccionaron 3 miARNs que se encontraron más abundantes en las muestras, con poca dispersión intra-grupo y que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Tabla 12).

Tabla 12. Abundancia diferencial de miARNs entre el grupo TB y el grupo control. Se indican el promedio de lecturas de cada grupo, la diferencia de cambio (fold change) entre ellos, el logaritmo en base 2 de dicho cambio (Log2FoldChange) y el p-valor ajustado.

	<i>Prom. Controles</i>	<i>Prom. TB</i>	<i>Fold Change</i>	<i>Log2Fold Change</i>	<i>p_{adj}</i>
hsa-miR-378a-3p	79.78	1716.57	0.05	-3.05	0,00
hsa-miR-126-3p	3020.71	343.02	8.78	3.12	0,00
hsa-miR-423-5p	1398.25	15113.19	0.09	-3.43	0,00

En la figura 13, se representan las lecturas sobre millón de lecturas mapeadas que tuvieron los tres miARNs mencionados anteriormente, para cada una de las muestras analizadas.

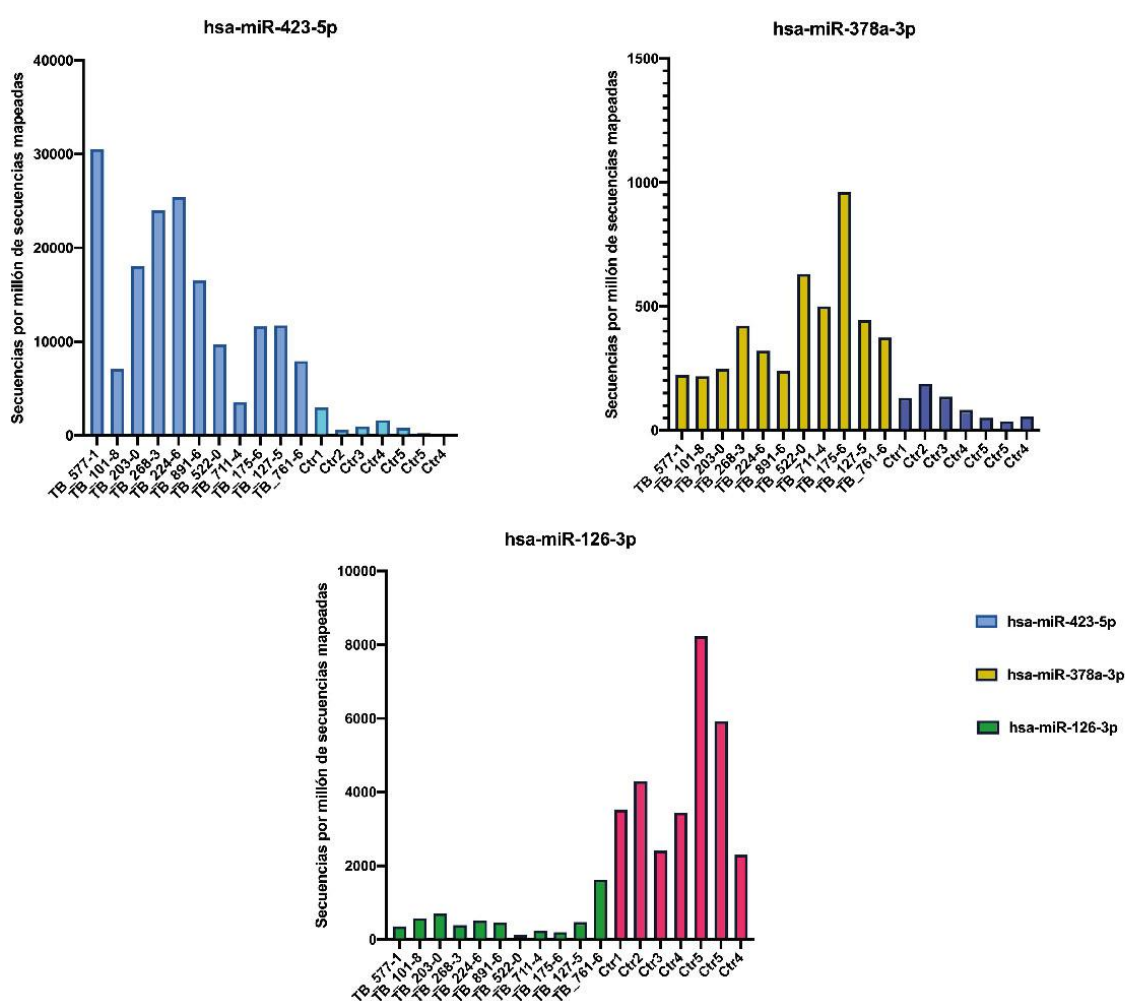


Figura 13. Representación gráfica de la cantidad de lecturas de miARNs por millón de secuencias mapeadas. miR-423-5p (azul), miR-378a-3p (amarillo) y miR-126-3p (verde). Los controles se identifican con otros colores para mayor claridad.

También se representaron los mismos datos en función de los tres miARNs diferencialmente abundantes (Figura 14). Se realizó un t-test múltiple, sobre las medias de todas las muestras por cada miARN. La diferencia entre las medias es estadísticamente significativa para estos miARNs.

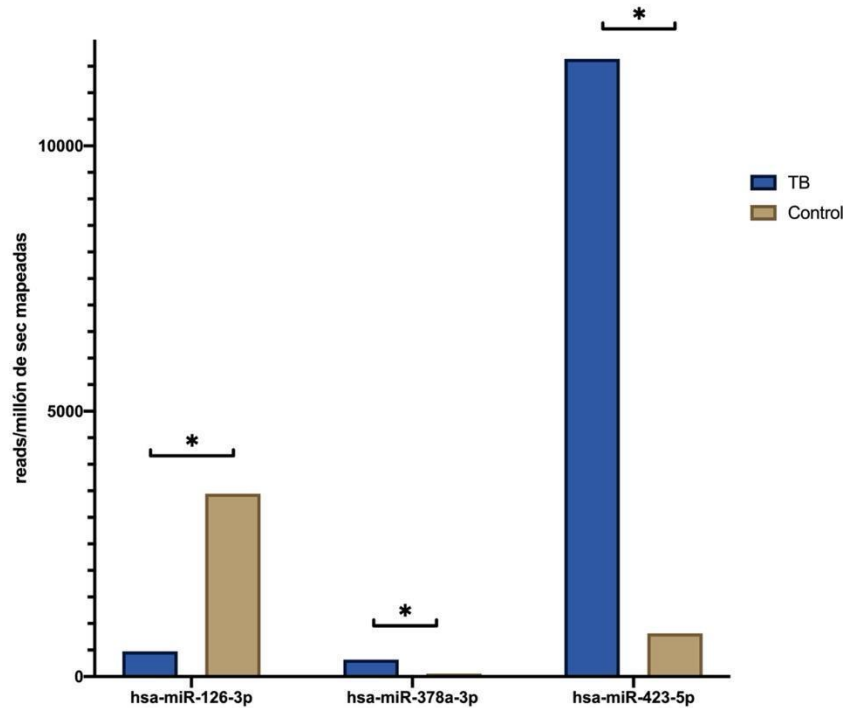


Figura 14. Comparación de miARNs diferenciales entre TB y controles. Se grafican el número de secuencias de cada miARN sobre el total de secuencias mapeadas. El asterisco indica diferencia significativa entre los grupos para miR-126-3p (p-valor= 0,0017), miR-378a-3p (p-valor = 0,009) y miR-423-5p (p-valor = 0,011), lo cuál coincide con el p-valor ajustado calculado por DESeq2.

Se desprende de este primer análisis que se encontraron miARNs diferencialmente abundantes entre ambos grupos y que esa diferencia es significativa. El miR-126-3p se observa en mayor proporción en el grupo control que en el grupo TB. Por el contrario, el miR-378a-3p y el miR-423-5p son más abundantes en el grupo TB respecto a los controles.

Dentro del grupo diagnosticado con TB, también se encuentran pacientes que ingresan a la UCI con diferentes estadios de la enfermedad y comorbilidades asociadas. La puntuación de APACHE II, cuyo valor elevado se asocia con peor pronóstico, es más alta en aquellos pacientes que fallecen. Se realizó un análisis de abundancia diferencial entre pacientes que fallecen (n=6) y que sobreviven (n=5).

Al analizar el total de lecturas en función de los tres miARNs seleccionados, se observa una abundancia en el miR-378a-3p en aquellos pacientes que fallecieron sin embargo esta diferencia no logra ser suficiente para ser estadísticamente significativa (t-test multivariado) (Figura 15).

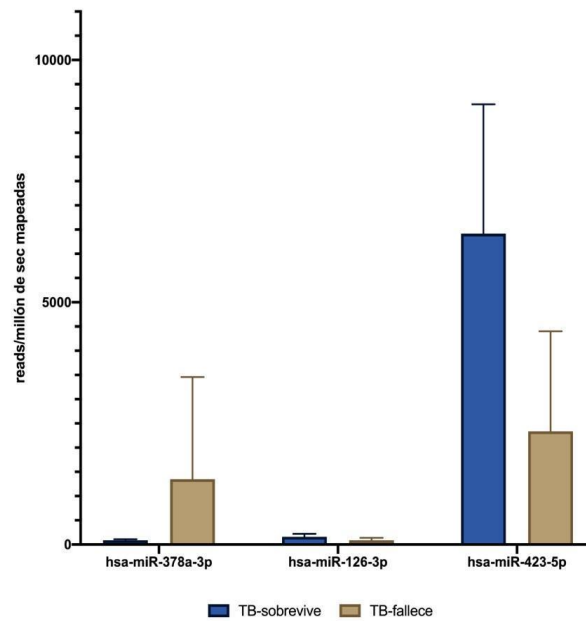


Figura 15. Cantidad de lecturas por millón de lecturas mapeadas en función de los miARN 378a-3p, 126-3p y 423-5p. Se distinguen los grupos de TB fallece y TB sobrevive

Por otra parte y buscando marcadores con valor pronóstico que pudieran informar sobre la gravedad de la enfermedad (en nuestro caso, distinguir personas que no logran sobrevivir luego del ingreso a la UCI de aquellas que sí lo hacen), observamos que una combinación de dos de los miARNs que observamos distinguen entre personas con TB de personas sanas, ofrecen un indicador de desenlace de la enfermedad de manera estadísticamente significativa (Figura 16).

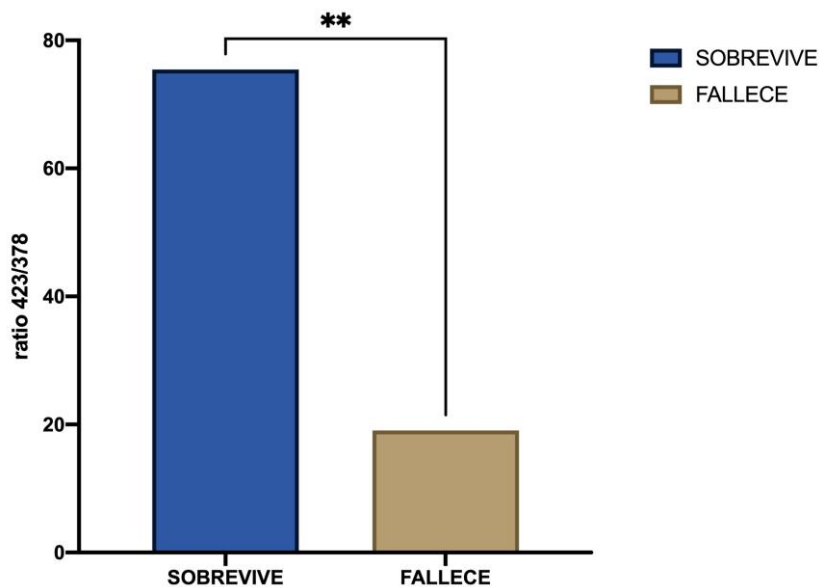


Figura 16. Relación entre miARNs 423-5p y 378-3p en pacientes que sobreviven (azul) o fallecen (marrón). Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa entre ambas poblaciones ($p < 0,01$).

En base a lo observado anteriormente, se procedió a validar el miR-378a-3p, el miR-423-5p y el miR-126-3p a través de una cuantificación relativa por RT-qPCR y del análisis por el método $\Delta\Delta Ct$. Como miARN control o “housekeeping” se optó por el hsa-let-7b-5p ya que se encuentra presente tanto en los sueros controles como en los TB con niveles similares de abundancia, sin diferencias significativas entre los TB y el grupo control (Tabla 13).

Tabla 13. miARN de referencia entre TB y el grupo control. Se indican los promedios de cada grupo, el fold change entre ellos y el p-valor ajustado.

	<i>Promedio TB</i>	<i>Promedio Controles</i>	<i>Fold Change</i>	<i>Log2FoldChange</i>	<i>p_{adj}</i>
hsa-let-7b-5p	5988.49	3239.1	0.54	-0.89	0.13

El análisis de los resultados de las curvas de PCR mostró diferencia significativa entre los controles y las muestras de TB cuando se cuantificó la abundancia relativa del miR-378a-3p (Figura 17-a) utilizando el miR-let7b como normalizador. No se pudo obtener valor estadístico significativo para sostener la diferencia observada en el miR-126-3p, aunque existe una tendencia a estar más abundante en los controles que en los sueros de pacientes con tuberculosis (Figura 17-b). Por otra parte, no se pudo obtener resultados para la validación del miR-423-5p ya que las curvas de amplificación de los controles negativos invalidaron la comparación de las curvas.

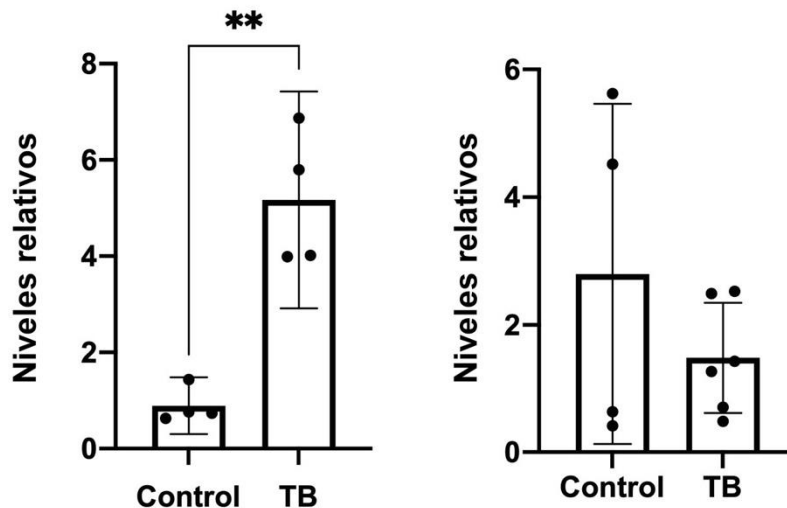


Figura 17. Cuantificación relativa de miARNs candidatos circulantes en suero. La cuantificación relativa de las curvas de qPCR se realizaron por el método de $\Delta\Delta Ct$. (a) cuantificación del miR-378a-3p relativa al let-7b-5p. (b) cuantificación del miR-126-3p relativa al let-7b-5p.

DISCUSION

1. Desarrollo de un método de secuenciación de regiones del genoma de *Mtb* que permite la caracterización de cepas y evaluar su perfil de resistencia a fármacos.

En el presente trabajo mostramos el desarrollo de un sistema de caracterización de cepas (linaje y presencia de resistencia genotípica a fármacos) mediante secuenciado profundo de regiones específicas del genoma de *Mtb*. En particular, y para mostrar la utilidad del método estudiamos las cepas aisladas del Sistema Penitenciario.

La prevalencia de TB en la población de privados de libertad (PPL) en el mundo es elevada. En general esta alta tasa está relacionada con características de esta población como condiciones de hacinamiento, VIH, alcoholismo, adicción, poco apego al tratamiento, etc. (Walter et al., 2021). Además, la convivencia con personas con TB en condiciones de sobrepoblación, poca ventilación y poco acceso al sistema de salud, aumentan las chances de transmisión de la TB dentro de las cárceles. La prevalencia de TB en cárceles en Uruguay es elevada y en 2020 se ubicó en 639 casos cada 100.000 habitantes según la CHLA-EP (20 veces mayor que para la población general). La situación del sistema penitenciario resulta crítica y hasta el año pasado se estimó que hay algo más de 130 presos por cada 100 plazas disponibles, siendo la densidad más alta registrada desde 2013 (Comisionado Parlamentario Penitenciario, 2020). Hasta marzo de 2021 la población carcelaria era de 13.402 internos, y la tendencia al hacinamiento crítico no parecería revertirse en los próximos años. La situación de la TB en el sistema penitenciario no es solamente crítica para los PPL, sino que además estas instituciones actúan como amplificadores de la tuberculosis comunitaria, manteniendo la propagación de la enfermedad desde los entornos penitenciarios hacia la población exterior ⁴¹.

Con el método desarrollado se realizó la caracterización de 47 aislados del sistema penitenciario (SP) obtenidos durante todo el año 2019. Se obtuvieron en total 47 ADN de cepas aisladas del SP, de los cuales 28 corresponden a aislados que se detectaron en el triage al ingreso del SP. De estos últimos, 25 ya tenían ingresos previos en el sistema mientras que 3 correspondían a personas que ingresaban por primera vez. Por otra parte, 19 aislados fueron detectados dentro de las cárceles. De los 47 aislados secuenciados, hubo uno donde no se logró la amplificación probablemente debido a la baja calidad del ADN utilizado, mientras que para 6 casos no se pudo detectar polimorfismos para clasificar el genotipo. Para estos últimos se realizó la tipificación por MIRU-VNTR, que dio como resultado la asignación al sublinaje LAM para 4 de ellos, mientras que en los 2 restantes no se logró determinar el linaje.

Los resultados observados para los 44 aislados tipificados distingue la presencia de 17 cepas del sublinaje LAM - 4.3 - (39%), 15 aislados correspondientes al linaje X - 4.1.1 - (34%), 11 cepas del linaje Haarlem - 4.1.2.1 - (25%), y 1 cepa del linaje S - 4.4.1.1 - (2%). En primer lugar, cabe destacar que las cepas circulantes son todas pertenecientes al linaje 4 de *M. tuberculosis*, el cual es el linaje más extendido en todo el mundo. En un trabajo previo de nuestro grupo, se pudieron tipificar mediante MIRU-VNTR 60 aislados de pacientes graves en la UCI y 90 aislados comunitarios, que no requirieron internación y que fueron obtenidos al azar del banco de ADN de aislados de la CHLA-EP entre los años 2016 hasta 2019. Los aislados circulantes tanto en UCI como en la comunidad también pertenecen al linaje 4, siendo LAM y Haarlem los sublinajes más abundantes en todos ellos ¹², también mostraron ser los más abundantes junto con el linaje S

en las cepas resistentes ¹¹. Se desprende de estos resultados que en el SP circula en mayor proporción una cepa en particular (sublinaje X) la cual no circula en la comunidad. Además, todas las personas cuyos aislados fueron tipificados como X, eran reincidentes o se encontraban dentro del SP.

Existe una asociación positiva entre algunos linajes de *Mycobacterium tuberculosis* y resistencia a fármacos anti-tuberculosis (como la familia Beijín), mientras que otros como LAM y X son más frecuentes en personas con VIH positivo ⁴². La familia X se encuentra en baja proporción en el continente americano, siendo el 1,2% de los casos reportados en la base de datos SITVIT2 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2/index.jsp>). Estados Unidos concentra el 76% de los casos asignados como X, reportados en esta base de datos.

Si bien la cepa encontrada se encuentra en muy baja proporción en los aislados de la comunidad, restaría profundizar esta información haciendo un relevamiento de cepas circulantes más amplio. Por ejemplo, realizar un seguimiento epidemiológico de la transmisión extra-cárcel a personal de los centros de reclusión y al entorno más próximo a los PPL en la comunidad. De esta forma se podría obtener información sobre su transmisión, así como el origen y procedencia de esta familia de *Mtb* en nuestro país.

Si bien hace falta una mayor vigilancia epidemiológica y hacer un estudio profundo de la transmisión intrafamiliar, o incluso de la transmisión dentro de los funcionarios penitenciarios, todo hace indicar que esta cepa circula activamente dentro del SP, con una diseminación comunitaria baja.

La resistencia a la TB surge principalmente como consecuencia de dos mecanismos: resistencia primaria o transmitida, es decir cuando una cepa resistente se transmite a un nuevo hospedero, o resistencia secundaria o adquirida, que ocurre por adquisición de mutaciones en genes "target" de una o más drogas. Estas mutaciones son por lo general sustituciones nucleotídicas, inserciones o deleciones pequeñas. A diferencia de otras bacterias, en *Mycobacterium tuberculosis* no hay transferencia horizontal de genes a través de elementos genéticos móviles como los plásmidos.

La secuenciación de genoma completo de *M. tuberculosis* proporciona información temporal y geográfica respecto a la adquisición de resistencia ⁴³. Se estima que la probabilidad de adquirir una mutación espontánea a rifampicina es de 1 en 10⁸ bacilos y 1 en 10⁶ bacilos para isoniazida, estreptomina y etambutol. Sin embargo, los datos observados indican que el número de eventos independientes de aparición de resistencia es mucho menor que los aislados resistentes registrados en el mundo. También, la tasa de mutaciones que causan resistencia varía dependiendo del linaje ²⁰. En otro estudio realizado por Lanzas et al., 2013 se registró un brote de MDR-TB en Panamá que se estaba dando por la expansión clonal de varias cepas de la familia LAM, dentro de la cual una familia en particular, LAM9-c1, estaba muy relacionada a cepas XDR de origen africano.

Las instituciones como hospitales y centros de reclusión no solamente actúan como amplificadores de la TB en la comunidad, sino que además aumentan el riesgo de la ocurrencia de tuberculosis multi-drogoresistente ⁴¹. Para la población de estudio de este trabajo, se detectaron mutaciones en la mayoría de los aislados, no obstante, el 57% de esas mutaciones son sinónimas (es decir no producen cambios en el aminoácido). Para aquellas mutaciones no

sinónimas, se detectó que al menos 27 aislados presentaban mutaciones en el gen *gyrA*: Glu62Gln, Ser95Thr y Gly668Asp. Este gen está asociado a resistencia a las fluoroquinolonas y en él se describen algunas mutaciones de alta confianza para resistencia fenotípica. Por ejemplo, la mutación Asp94Gly ocurre frecuentemente en cepas XDR⁴⁴. En cualquier caso, las mutaciones detectadas por nuestro flujo de trabajo, que a su vez fueran corroboradas por los resultados observados de PhyResSE, no se encuentran reportadas en las tablas de datos para mutaciones asociadas a resistencia a fluoroquinolonas⁴⁵.

También se encontraron dos mutaciones puntuales para el gen *rpoB* en dos aislados diferentes, Leu275Val en el 100% de las secuencias (163x de cobertura) y la mutación Met349Thr en el 99% de las secuencias (169x de cobertura) respectivamente. Sin embargo, estas mutaciones tampoco se encuentran reportadas asociadas a resistencia fenotípica. El gen *rpoB* codifica para la subunidad beta de la ARN polimerasa y en el 96% de los aislados clínicos que exhiben resistencia fenotípica, el mismo presenta alguna alteración en la región 507-533, como la mutación Ser531Leu⁴⁶. Ninguno de los SNPs observados por nuestro flujo de trabajo, ni tampoco aquellos detectados con PhyResSE³⁵ coincidieron con esta región o se encontraron reportados en la bibliografía.

Por otra parte, se encontró la mutación c1472337t (c492t) en el gen *rrs* para tres aislados y dicha observación fue corroborada por el análisis de PhyResSE. Esta mutación se encuentra reportada por^{32,47}, aunque no se encontró ninguna otra evidencia que indicara que la asociación con la resistencia fenotípica está fuertemente relacionada. Sin embargo, mutaciones en el gen *rrs* se encuentran asociadas a resistencia a estreptomycin, particularmente las regiones 530 y 912, que son los sitios más frecuentes. En particular las mutaciones a514c, c517t y a908g fueron encontradas en cepas Beijing resistentes⁴⁸. También existe evidencia de que el tipo y la frecuencia de mutaciones en *rrs* dependen del sitio geográfico y que algunos linajes, como Beijing o LAM están más frecuentemente asociados con la ocurrencia de resistencia a estreptomycin⁴⁹. Los aislados con la mutación c492t corresponden a los aislados 1, 32 y 45 que fueron tipificados como LAM.

El análisis por PhyResSE detectó 10 aislados con mutaciones en genes de resistencia. En todos los casos, las mutaciones encontradas fueron concordantes con lo observado en nuestro flujo de trabajo, por lo que es una buena aproximación para validar el análisis informático realizado. De todo lo anterior, surge que todos los aislados estudiados son sensibles a los fármacos de primera línea utilizados para tratar la TB. Sin embargo, es necesario controlar los aislados con resistencia a estreptomycin detectados, ya que, de requerir el tratamiento con este fármaco, podría conducir a resistencia al mismo.

De esta forma, por medio del análisis informático, se logró filtrar y examinar la información contenida en las secuencias de ADN de aislados de TB. Se logró discriminar los linajes de la mayoría de cepas, evidenciar cambios en los genes asociados a resistencia a fármacos anti-tuberculosis y determinar si estaban asociados a resistencia fenotípica. El flujo de trabajo propuesto tiene la ventaja de que puede ser ajustado para la búsqueda de cepas y de resistencia más frecuentes en la realidad local. A través del secuenciado profundo se obtiene información crítica que puede mejorar los tratamientos de TB. Se pueden conocer las cepas circulantes, si

están asociadas con peor pronóstico y tener conocimiento de la predisposición genotípica de un aislado a desarrollar resistencia a un fármaco para poder hacer un mejor uso de los antibióticos. La existencia de programas online que realizan las mismas funciones haría posible la aplicación del análisis informático sin tener conocimiento previo de línea de comandos ni herramientas informáticas. Por otro lado, el sistema utilizado en este trabajo también podría mejorarse, por ejemplo, modificando el pool-L para incluir más polimorfismos que permitan una mejor resolución de las cepas del linaje 4 (las únicas observadas en nuestro país) y quitar los cebadores de los linajes menos frecuentes. También podrían ser incorporados, en el pool-R, nuevos genes asociados a resistencia en la medida que surjan.

2. *Búsqueda de marcadores moleculares (miARNs) circulantes en suero de pacientes con TB grave.*

El avance tecnológico en el área de la biología molecular y en particular en el área de secuenciación, resulta un insumo necesario para la epidemiología molecular de la TB. Cada vez es más urgente aunar todos los esfuerzos posibles para alcanzar el objetivo de erradicación de la TB en el mundo. Hoy en día, se puede contar con información precisa de cuáles son las cepas circulantes en una comunidad dada, y poner el foco en variantes de preocupación (como el caso de Beijing, o variantes LAM asociadas a casos MDR) y cómo fue la relación epidemiológica entre ellas. Toda esta información al servicio de la clínica de la TB podría mejorar el rastreo y el muestreo de los casos activos, a pesar de ello, también se precisan biomarcadores que puedan revelar la progresión desde la enfermedad latente a una enfermedad avanzada o que pronostiquen la probabilidad de reactivación luego de curarse. La existencia de biomarcadores robustos de TB podría prevenir o advertir casos de enfermedad grave o brotes de TB en la comunidad.

Los ácidos nucleicos extracelulares, tanto dentro de vesículas como asociados a proteínas de unión a ARN o ADN, se pueden encontrar circulando en sangre. Las variaciones en su concentración y su composición son reflejo de estados metabólicos particulares o procesos de enfermedad y es por ello que conocer las secuencias y las abundancias de estos ácidos nucleicos puede ser información útil para la búsqueda de biomarcadores. Se ha visto que *Mycobacterium tuberculosis* tiene la habilidad de evadir la respuesta del sistema inmune y sobrevivir de forma intracelular en el hospedero. Los mecanismos de evasión también incluyen la supresión de ciertos miARNs del hospedero involucrados en la regulación del sistema inmune y adaptativo⁵⁰. Algunos miARN que se han visto más abundantes dentro de pacientes con TB son miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-99b-5p y miR-132-5p, que están asociados negativamente con la respuesta inflamatoria del hospedero, participando en la disminución de la señalización de los receptores de tipo toll (TLRs), favoreciendo el crecimiento de la bacteria⁵¹. Otros miARNs como miR-29a-3p y miR-125-5p que se encuentran más abundantes en macrófagos infectados, directamente actúan sobre IFN-gamma y TNF-alfa suprimiendo la respuesta inmune⁵². También se destacaron a hsa-miR-196b y hsa-miR-376c como potenciales marcadores de diagnóstico, luego de analizar suero de 15 pacientes con TB y 82 controles. Estos fueron validados por RT-PCR³¹. Lo cierto es que existen numerosos artículos que proponen miARNs como marcadores de TB, pero los resultados no son muy consistentes. Si bien es sabido que las bacterias, a través de la expresión de miARNs, pueden manipular diferentes vías moleculares del hospedero⁵³ y que los ARNs pequeños en vesículas extracelulares pueden actuar en la comunicación a distancia entre

células, no se ha logrado comprender en profundidad cuáles son los mecanismos celulares detrás de ello. Los perfiles de expresión de miARN también dependen de características de la población de estudio, como edad, sexo, comorbilidades, aptitud del sistema inmune pero también del tipo de cepa de *Mtb* o del estado o avance de la enfermedad⁵⁴. También es posible que ocurran ciertos sesgos en cuanto a los diferentes métodos de aislación, así como degradación de ARN en los biofluidos, lo cual hace que la cuantificación e identificación de la abundancia de los ARNs extracelulares esté sujeto a artefactos producidos durante el aislamiento y/o procedimiento⁵⁵.

Para tratar de mitigar estas variaciones en la cuantificación de muestras, en este trabajo todos los sueros de pacientes graves y controles, partieron de la misma cantidad de suero y fueron extraídos de la misma manera con kit comercial diseñado para la extracción de miARNs.

De la población de pacientes graves internados en UCI utilizados para este análisis, se desprende de sus datos clínicos que se trata de una cohorte con predominancia masculina (62%) en torno a los 40 años de edad, donde el 62% falleció en su estadía en la UCI con un puntaje promedio de APACHE II de 29. Se trata entonces de pacientes jóvenes, con un *score* de severidad muy alto, que se corresponde con una mortalidad que triplica la mortalidad promedio observada en otros casos. A partir de la extracción de ARN, se realizaron las bibliotecas para secuenciación de ARNs pequeños y se obtuvieron secuencias de muy buena calidad que mapean más del 90% contra el genoma humano.

Del análisis de expresión diferencial, surgieron tres candidatos como marcadores de enfermedad. El hsa-miR-378a-3p y el hsa-miR-423-5p se hallaron más abundantes en el suero de los pacientes graves con TB mientras que el hsa-miR-126-3p estaba disminuido en este grupo. El análisis realizado por DESeq2 encontró diferencias significativas. El miR-378a-3p está asociado a la regulación negativa de la proliferación celular y está involucrado en el silenciamiento de la respuesta inmune⁵⁶. Asimismo, el miR-126-3p se encuentra asociado a la regulación negativa de la migración celular y supresión de tumores⁵⁷. Sin embargo, estos dos miARNs no se encuentran reportados como marcadores de TB. En cambio, el miR-423-5p está al menos reportado en un artículo científico como más abundante y de forma estadísticamente significativa, cuando se comparan suero de pacientes con tuberculosis pulmonar activa y controles sanos⁵⁸. Los autores señalan, además, que se logró establecer una asociación entre la abundancia de este microARN y la inhibición en la maduración del fago-lisosoma en macrófagos.

También se realizó un análisis de abundancia diferencial de miARNs circulantes en suero entre pacientes con TB que sobrevivieron y que fallecieron en la UCI. En este caso, el bajo número de muestras y la dispersión de los datos no permitieron observar miARNs con diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para ser considerados candidatos con valor pronóstico. Restaría aumentar el número de muestras analizadas, para poder determinar si el miR-378a-3p o el 423-5p son además biomarcadores pronósticos de gravedad.

Tuberculosis: de la clínica al laboratorio y del laboratorio al paciente

En suma, partimos de una población de estudio muy heterogénea que ingresaron a UCI por cuadro clínico compatible con tuberculosis pulmonar, que resultaron tener cultivo positivo, pero que también tenían comorbilidades asociadas como tabaquismo, consumo de drogas, situación de calle y donde 1 de cada 5 era VIH positivo. Existen a su vez, diferentes estadios en la progresión de la enfermedad en el ingreso a la UCI, que pueden verse reflejados en la puntuación de APACHE II. La estadía en UCI (que en general es más corta en pacientes que fallecen), podría ser una aproximación también para definir diferentes estadios, indicando una enfermedad muy avanzada. Cuando se analizó la cohorte en función de la mortalidad no se encontraron miARNs circulantes en suero significativamente abundantes en un grupo respecto a otro, sin embargo utilizando la relación entre la abundancia de dos miARNs fue posible diferenciar entre pacientes con un desenlace fatal de aquellos que logran sobrevivir, lo cual podría constituir una información clínica relevante para el manejo de estos pacientes.

CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS

La presente postulación resume en los dos últimos grandes trabajos, los aportes realizados al estudio de la Tuberculosis en Uruguay llevados adelante por nuestro grupo en los últimos 15 años. El trabajo realizado se llevó adelante de manera colaborativa y multidisciplinaria, recibiendo aportes desde la epidemiología y la clínica hasta el laboratorio de biología molecular. El trabajo en conjunto de médicos, epidemiólogos, laboratoristas, bioquímicos y biólogos moleculares permitió obtener datos relevantes de la tuberculosis en Uruguay por primera vez, y obtener información de utilidad para el sistema de salud del país. Además, de validarse los datos encontrados en los pacientes con TB severa, aportaría información de gran importancia para médicos que permita un manejo más adecuado de pacientes graves.

Respecto a la primera parte que se presenta en esta postulación, se desarrolló una metodología de tipificación de cepas y de identificación de resistencia basado en secuenciación profunda que puede ser fácilmente transferible y aplicable en los laboratorios de biología molecular que normalmente realizan el seguimiento de los casos de TB en el país. De hecho, en el marco del proyecto FMV_3_2018_1_148367, se está realizando la transferencia de esta metodología a la CHLAT-EP. Además, estamos realizando una capacitación para que en algunos casos se realice secuenciación de genoma completa de cepas de interés. Esta metodología, ya es utilizada en algunos países como Inglaterra para todas sus cepas aisladas y puede ser una herramienta aplicable en nuestro país con una inversión inicial. Respecto al sistema desarrollado, el mismo puede mejorarse para hilar más fino entre las cepas que circulan en la población (datos obtenidos en todos nuestros trabajos previos ^{10-12,59,60} y en este trabajo muestran que sólo circulan cepas del linaje 4), así como también seleccionar las mutaciones asociadas a resistencias más frecuentes. Los programas de análisis online son una muy buena opción para realizar informes de tipificación y de resistencia en base a la secuenciación profunda de los genes o de los genomas de interés, y requiere entrenamiento informático mínimo (que estamos realizando en este año para funcionarios de la CHLA-EP).

A modo de perspectiva de esta primera parte del trabajo, sería de interés poder continuar con el rastreo de los linajes X en los PPL, su inserción en la comunidad y realizar un monitoreo de los casos observados de resistencia a estreptomycin. En este sentido también, se podrían secuenciar los genomas de estas cepas resistentes para intentar establecer su enlace epidemiológico.

Respecto a los marcadores moleculares de TB grave, encontramos 3 miARNs candidatos con valor diagnóstico y una combinación de ellos muestra una capacidad de diferenciar dentro de los pacientes graves aquellos con desenlace fatal. Encontrar marcadores con valor pronóstico al que puedan ser utilizados al ingreso de la UCI sería de gran importancia para tomar conductas terapéuticas más adecuadas para estos pacientes. Para ello sería importante reproducir los resultados obtenidos en un set de muestras mayor para poder disminuir la incertidumbre y también comparar con otros grupos de pacientes graves con otras patologías (por ejemplo, neumonías comunitarias, o COVID-19) para observar si estos marcadores son específicos de TB o se deben a otras características inespecíficas de la gravedad del cuadro clínico. Asimismo, podrían clasificarse a los pacientes según otros criterios, como avance o gravedad de la enfermedad, o estadía corta y estadía larga, para observar si los marcadores se mantienen entre los grupos o se distinguen nuevos candidatos.

Tuberculosis: de la clínica al laboratorio y del laboratorio al paciente

Otro aspecto interesante para abordar podría ser estudiar la expresión diferencial de otros ARNs pequeños no codificantes como ARN transferencia, ARN ribosomal, ARNs largos, que fueron secuenciados en este estudio, pero que no fueron analizados.

Como se muestra en la introducción, la TB continúa siendo un grave problema de salud en el mundo y en nuestro país. En la postulación se presentan dos abordajes llevados adelante por nuestro grupo para aportar a un mejor conocimiento de la enfermedad. Por un lado, desde el punto de vista de la epidemiología molecular: identificando por primera vez en nuestro país, las cepas circulantes en distintos subgrupos de enfermos con TB y estudiando, al mismo tiempo, la presencia de multiresistencia a drogas antituberculosas.

Por otra parte, se realizó la caracterización de la respuesta del hospedero frente a la infección y se buscaron y encontraron ARNs pequeños circulantes en suero biomarcadores específicos de la enfermedad con potencial valor pronóstico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barberis I, Bragazzi NL, Galluzzo L, Martini M. The history of tuberculosis: From the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *J Prev Med Hyg.* 2017;58(1).
2. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2021.*; 2021.
3. World Health Organization. WHO | WHO End TB Strategy. *World Heal Organ.* 2015.
4. Bañuls AL, Sanou A, Van Anh NT, Godreuil S. Mycobacterium tuberculosis: Ecology and evolution of a human bacterium. *J Med Microbiol.* 2015;64(11). doi:10.1099/jmm.0.000171
5. Bussi C, Gutierrez MG. Mycobacterium tuberculosis infection of host cells in space and time. *FEMS Microbiol Rev.* 2019;43(4). doi:10.1093/femsre/fuz006
6. Guirado E, Schlesinger LS. Modeling the Mycobacterium tuberculosis granuloma - the critical battlefield in host immunity and disease. *Front Immunol.* 2013;4(APR). doi:10.3389/fimmu.2013.00098
7. Sakamoto K. The Pathology of Mycobacterium tuberculosis Infection. *Vet Pathol.* 2012;49(3). doi:10.1177/0300985811429313
8. Ford CB, Shah RR, Maeda MK, et al. Mycobacterium tuberculosis mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. *Nat Genet.* 2013;45(7). doi:10.1038/ng.2656
9. Gagneux S. Ecology and evolution of Mycobacterium tuberculosis. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(4). doi:10.1038/nrmicro.2018.8
10. Berná L, Iraola G, Greif G, et al. Whole-genome sequencing of an isoniazid-resistant clinical isolate of Mycobacterium tuberculosis strain MtURU-002 from Uruguay. *Genome Announc.* 2014;2(4). doi:10.1128/genomeA.00655-14
11. Greif G, Coitinho C, Rivas C, Van Ingen J, Robello C. Molecular analysis of isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Uruguay. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2012;16(7). doi:10.5588/ijtld.11.0559
12. Hurtado J, Coitinho C, Nin N, et al. Clinical and epidemiological features of tuberculosis isolated from critically ill patients. *Rev Argent Microbiol.* 2021. doi:https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.02.011
13. Coitinho C, Greif G, Robello C, Laserra P, Willery E, Supply P. Rapidly progressing tuberculosis outbreak in a very low risk group. *Eur Respir J.* 2014. doi:10.1183/09031936.00150413
14. Satta G, Lipman M, Smith GP, Arnold C, Kon OM, McHugh TD. Mycobacterium tuberculosis and whole-genome sequencing: how close are we to unleashing its full potential? *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(6):604-609. doi:10.1016/j.cmi.2017.10.030
15. Jena L, Waghmare P, Kashikar S, Kumar S, Harinath BC. Computational approach to understanding the mechanism of action of isoniazid, an anti-TB drug. *Int J Mycobacteriology.* 2014;3(4). doi:10.1016/j.ijmyco.2014.08.003
16. Fontalvo Rivera D, Gómez Camargo D. Genes del Mycobacterium tuberculosis involucrados en la patogenicidad y resistencia a antibióticos durante la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. *Medicas UIS.* 2015;28(1).

17. CHLA-EP. Guía Nacional para el manejo de la Tuberculosis. 2016.
18. Rajendran M. Prevalence of Multidrug Resistant Tuberculosis among TB Patients in Malaysia. In: ; 2021. doi:10.1183/13993003.congress-2021.pa1726
19. Lempens P, Meehan CJ, Vandellannoote K, et al. Isoniazid resistance levels of *Mycobacterium tuberculosis* can largely be predicted by high-confidence resistance-conferring mutations. *Sci Rep*. 2018;8(1). doi:10.1038/s41598-018-21378-x
20. Dookie N, Rambaran S, Padayatchi N, Mahomed S, Naidoo K. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(5). doi:10.1093/jac/dkx506
21. Palomino JC, Martin A. Drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics*. 2014;3(3). doi:10.3390/antibiotics3030317
22. Berrada ZL, Lin SYG, Rodwell TC, et al. Rifabutin and rifampin resistance levels and associated *rpoB* mutations in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;85(2). doi:10.1016/j.diagmicrobio.2016.01.019
23. Tiberi S, du Plessis N, Walzl G, et al. Tuberculosis: progress and advances in development of new drugs, treatment regimens, and host-directed therapies. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(7). doi:10.1016/S1473-3099(18)30110-5
24. Lanoix JP, Gaudry S, Flicoteaux R, Ruimy R, Wolff M. Tuberculosis in the intensive care unit: A descriptive analysis in a low-burden country. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2014. doi:10.5588/ijtld.13.0901
25. Muthu V, Agarwal R, Dhooria S, Aggarwal AN, Behera D, Sehgal IS. Outcome of critically ill subjects with tuberculosis: Systematic review and meta-analysis. *Respir Care*. 2018;63(12). doi:10.4187/respcare.06190
26. López B, Aguilar D, Orozco H, et al. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol*. 2003;133(1). doi:10.1046/j.1365-2249.2003.02171.x
27. Kendall EA, Fofana MO, Dowdy DW. Burden of transmitted multidrug resistance in epidemics of tuberculosis: A transmission modelling analysis. *Lancet Respir Med*. 2015;3(12). doi:10.1016/S2213-2600(15)00458-0
28. Tosar JP, Gámbaro F, Sanguinetti J, Bonilla B, Witwer KW, Cayota A. Assessment of small RNA sorting into different extracellular fractions revealed by high-throughput sequencing of breast cell lines. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(11). doi:10.1093/nar/gkv432
29. Murchison EP, Hannon GJ. miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16(3). doi:10.1016/j.ceb.2004.04.003
30. Walzl G, McNerney R, du Plessis N, et al. Tuberculosis: advances and challenges in development of new diagnostics and biomarkers. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(7). doi:10.1016/S1473-3099(18)30111-7
31. Zhang H, Sun Z, Wei W, et al. Identification of serum microRNA biomarkers for tuberculosis using RNA-seq. *PLoS One*. 2014;9(2). doi:10.1371/journal.pone.0088909
32. Coll F, McNerney R, Guerra-Assunção JA, et al. A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Nat Commun*. 2014;5(4812). doi:10.1038/ncomms5812

33. Brown SS, Chen YW, Wang M, Clipson A, Ochoa E, Du MQ. PrimerPooler: Automated primer pooling to prepare library for targeted sequencing. *Biol Methods Protoc.* 2017;2(1). doi:10.1093/biomethods/bpx006
34. Joshi N, Fass J. Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33) [Software]. Available at <https://github.com/najoshi/sickle>. 2011:2011.
35. Feuerriegel S, Schleusener V, Beckert P, et al. PhyResSE: a Web Tool Delineating Mycobacterium tuberculosis Antibiotic Resistance and Lineage from Whole-Genome Sequencing Data. *J Clin Microbiol.* 2015;53(6):1908-1914. doi:10.1128/jcm.00025-15
36. Aparicio-Puerta E, Lebrón R, Rueda A, et al. SRNAbench and sRNAtoolbox 2019: intuitive fast small RNA profiling and differential expression. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(W1). doi:10.1093/nar/gkz415
37. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12). doi:10.1186/s13059-014-0550-8
38. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(20). doi:10.1093/nar/gni178
39. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc.* 2008;3(6). doi:10.1038/nprot.2008.73
40. Cabibbe AM, Spitaleri A, Battaglia S, et al. Application of targeted next-generation sequencing assay on a portable sequencing platform for culture-free detection of drug-resistant tuberculosis from clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2020;58(10). doi:10.1128/JCM.00632-20
41. Warren JL, Grandjean L, Moore DAJ, et al. Investigating spillover of multidrug-resistant tuberculosis from a prison: A spatial and molecular epidemiological analysis. *BMC Med.* 2018. doi:10.1186/s12916-018-1111-x
42. Couvin D, David A, Zozio T, Rastogi N. Macro-geographical specificities of the prevailing tuberculosis epidemic as seen through SITVIT2, an updated version of the Mycobacterium tuberculosis genotyping database. *Infect Genet Evol.* 2019;72. doi:10.1016/j.meegid.2018.12.030
43. Ektefaie Y, Dixit A, Freschi L, Farhat MR. Globally diverse Mycobacterium tuberculosis resistance acquisition: a retrospective geographical and temporal analysis of whole genome sequences. *The Lancet Microbe.* 2021;2(3). doi:10.1016/S2666-5247(20)30195-6
44. Singh R, Dwivedi SP, Gaharwar US, Meena R, Rajamani P, Prasad T. Recent updates on drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *J Appl Microbiol.* 2020;128(6). doi:10.1111/jam.14478
45. Chaiyachat P, Chaiprasert A, Nonghanphithak D, et al. Whole-genome analysis of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis reveals novel mutations associated with fluoroquinolone resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2021;58(3). doi:10.1016/j.ijantimicag.2021.106385
46. Dreyer V, Utpatel C, Kohl TA, et al. Detection of low-frequency resistance-mediating SNPs in next-generation sequencing data of Mycobacterium tuberculosis complex strains with binoSNP. *Sci Rep.* 2020;10(1). doi:10.1038/s41598-020-64708-8

47. Miotto P, Tessema B, Tagliani E, et al. A standardised method for interpreting the association between mutations and phenotypic drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Eur Respir J*. 2017. doi:10.1183/13993003.01354-2017
48. Smittipat N, Juthayothin T, Billamas P, et al. Mutations in rrs, rpsL and gidB in streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Thailand. *J Glob Antimicrob Resist*. 2016;4. doi:10.1016/j.jgar.2015.11.009
49. Lipin MY, Stepanshina VN, Shemyakin IG, Shinnick TM. Association of specific mutations in katG, rpoB, rps L and rrs genes with spoligotypes of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Russia. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(6). doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01711.x
50. Sinigaglia A, Peta E, Riccetti S, Venkateswaran S, Manganello R, Barzon L. Tuberculosis-Associated MicroRNAs: From Pathogenesis to Disease Biomarkers. *Cells*. 2020;9(10). doi:10.3390/cells9102160
51. Kim JK, Kim TS, Basu J, Jo EK. MicroRNA in innate immunity and autophagy during mycobacterial infection. *Cell Microbiol*. 2017;19(1). doi:10.1111/cmi.12687
52. Rajaram MVS, Ni B, Morris JD, et al. Mycobacterium tuberculosis lipomannan blocks TNF biosynthesis by regulating macrophage MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) and microRNA miR-125b. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(42). doi:10.1073/pnas.1112660108
53. Maudet C, Mano M, Eulalio A. MicroRNAs in the interaction between host and bacterial pathogens. *FEBS Lett*. 2014;588(22). doi:10.1016/j.febslet.2014.08.002
54. Hoefsloot W, Van Ingen J, Andrejak C, et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: An NTM-NET collaborative study. *Eur Respir J*. 2013;42(6):1604-1613. doi:10.1183/09031936.00149212
55. Max KEA, Bertram K, Akat KM, et al. Human plasma and serum extracellular small RNA reference profiles and their clinical utility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(23). doi:10.1073/pnas.1714397115
56. Dubois-Camacho K, Diaz-Jimenez D, De la Fuente M, et al. Inhibition of miR-378a-3p by Inflammation Enhances IL-33 Levels: A Novel Mechanism of Alarmin Modulation in Ulcerative Colitis. *Front Immunol*. 2019;10. doi:10.3389/fimmu.2019.02449
57. Felli N, Felicetti F, Lustri AM, et al. miR-126&126* Restored Expressions Play a Tumor Suppressor Role by Directly Regulating ADAM9 and MMP7 in Melanoma. *PLoS One*. 2013;8(2). doi:10.1371/journal.pone.0056824
58. Tu H, Yang S, Jiang T, et al. Elevated pulmonary tuberculosis biomarker miR-423-5p plays critical role in the occurrence of active TB by inhibiting autophagosome-lysosome fusion. *Emerg Microbes Infect*. 2019;8(1). doi:10.1080/22221751.2019.1590129
59. Coitinho C, Greif G, Robello C, van Ingen J, Rivas C. Identification of Mycobacterium tuberculosis complex by polymerase chain reaction of Exact Tandem Repeat-D fragment from mycobacterial cultures. *Int J Mycobacteriology*. 2012;1(3):146-148. doi:10.1016/j.ijmyco.2012.07.002
60. Coitinho C, Greif G, Robello C, Laserra P, Willery E, Supply P. Rapidly progressing tuberculosis outbreak in a very low risk group. *Eur Respir J*. 2014;43(3). doi:10.1183/09031936.00150413

ANEXO. Publicaciones realizadas por el grupo en el tema.



BRIEF REPORT

Clinical and epidemiological features of tuberculosis isolated from critically ill patients



Joaquín Hurtado^a, Cecilia Coitinho^b, Nicolás Nin^c, María Buroni^c,
Francisco Javier Hurtado^{c,d}, Carlos Robello^{a,e}, Gonzalo Greif^{a,*}

^a Laboratorio de Interacciones Hospedero-Patógeno/Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur Montevideo (IPM), Montevideo, Uruguay

^b Laboratory of Microbiology, Anti-tuberculosis and Prevalent Diseases Honorary Commission (CHLA-EP), Montevideo, Uruguay

^c Intensive Care Unit, Hospital Español Dr. "Juan J. Crottoggini", ASSE, Montevideo, Uruguay

^d Departamento de Fisiopatología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^e Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Received 20 July 2020; accepted 3 February 2021

Available online 15 May 2021

KEYWORDS

Mycobacterium tuberculosis;
Pulmonary infections;
Critically ill patients

Abstract Human tuberculosis is still a major world health concern. In Uruguay, contrary to the world trend, an increase in cases has been observed since 2006. Although the incidence of MDR-resistant strains is low and no cases of XDR-TB were registered, an increase in the number of patients with severe tuberculosis requiring critical care admission was observed. As a first aim, we performed the analysis of the genetic structure of strains isolated from patients with severe tuberculosis admitted to an intensive care unit. We compared these results with those corresponding to the general population observing a statistically significant increase in the Haarlem genotypes among ICU patients (53.3% vs 34.7%; $p < 0.05$). In addition, we investigated the association of clinical outcomes with the genotype observing a major incidence of hepatic dysfunctions among patients infected with the Haarlem strain ($p < 0.05$). The cohort presented is one of the largest studied series of critically ill patients with tuberculosis.

© 2021 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

PALABRAS CLAVE

Mycobacterium tuberculosis;
Infecciones pulmonares;
Medicina intensiva

Tuberculosis en la unidad de cuidados intensivos: características clínicas y epidemiológicas

Resumen La tuberculosis (TB) aún representa un problema mayor de salud pública. En Uruguay, contrariamente a la tendencia mundial, se ha observado un incremento en el número de casos desde 2006. Aunque la incidencia de casos de multidrogresistencia (MDR) es baja y no

* Corresponding author.

E-mail address: gonzalo.greif@pasteur.edu.uy (G. Greif).

se han reportados casos de resistencia a fármacos de primera y segunda línea de tratamiento (XDR), se ha observado un incremento en el número de casos con TB grave, que requieren internación en unidad de terapia intensiva (CTI). Como primer objetivo del presente trabajo, se analizó la estructura genética de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes internados en CTI. Comparamos estos resultados con los obtenidos con cepas circulantes en la comunidad. Observamos un incremento estadísticamente significativo del genotipo Haarlem en los pacientes internados en CTI (53,3 vs. 34,7%; $p < 0,05$). Además, investigamos la asociación del desenlace clínico con el genotipo, y encontramos una mayor incidencia de disfunción hepática en los pacientes infectados con la cepa Haarlem ($p < 0,05$). La cohorte presentada en este trabajo corresponde a una de las series con mayor número de pacientes con tuberculosis que requirieron internación en CTI.

© 2021 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Although tuberculosis (TB) incidence is decreasing worldwide¹⁵, Uruguay has been reporting an increase in the number of cases since 2006. Despite the efforts made by the National Program Against Tuberculosis, the incidence rate in 2019 was 30 cases per 100 000 inhabitants, placing Uruguay above the average of the region¹⁵. Based on this scenario, more cases with severe TB were diagnosed and admitted to Intensive Care Unit (ICU) during the last years.

TB in critical care is associated with respiratory and other organ failures and requires ICU admission for advanced vital support. Despite the availability of effective therapies, mortality rates remain between 15.5 and 65.9% in critical care patients^{10,11}. In Uruguay, a high mortality rate (>50%) was observed in TB cases that required ICU admission.

Information from classical and molecular epidemiology, along with patient clinical data represent key elements to achieve better control of the disease³.

The genotypic variations, especially bacterial lineages, are associated with changes in transmission capacity and also in the ability to acquire drug resistance^{2,7-9}. Thus, changes in the prevalence of specific lineages or sub-lineages could have important consequences for the observed epidemiology and outcome of TB disease^{12,14}.

We hypothesized that critically ill TB patients could be associated with strain virulence. This study aimed to describe the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* using classical genotyping methods of clinical isolates obtained from TB patients in the critical care setting, and to analyze them with the genetic background structure observed in community TB. In addition, we aimed to determine the possible association of comorbidities and organ dysfunctions observed in these patients according to the TB genotype causing the disease.

The research protocol used in this work was presented and approved by the Clinical Research Ethics Committee of Hospital Español, and has been performed following the ethical standards of the 1964 Declaration of Helsinki.

Sixty *M. tuberculosis* isolates obtained from critically ill patients from a general public hospital (Hospital Español – ASSE, Montevideo, Uruguay) were genotyped and compared

to ninety-five randomly selected community isolates within the same period (Suppl. Table 1 and Suppl. Fig. 1).

All the community sample isolates correspond to patients treated with the standard drug protocol (daily HREZ for the first two months, four months HR 3 days a week). The cultures became negative after 3 months of treatment (Suppl. Table 1 and Suppl. Fig. 1). All the community samples were obtained from TB patients that did not require ICU admission at any time during treatment.

Patients with TB admitted to the ICU were classified according to a TB clinical severity score as having low, moderate, and high risk TB disease¹. Comorbidities and organ dysfunctions were documented upon admission, along with common clinical and laboratory studies.

Isolate characteristics were summarized for each group (Community and Critically ill patient isolates) in Supplementary Table 1. In addition, the analysis pipeline was shown in Supplementary Figure 1. Microbiological cultures and DNA extractions were performed and stored, as previously described⁴. Molecular typing using spoligotyping and MIRU-VNTR were performed as described in Supplementary Figure 1.

Lineage assignment was carried out based on similarity search and UPGMA tree when comparing reference strains located in the server with our isolates with a distance less than 0.3 using www.miru-vntr.org tool. Comparative analysis between strain distribution of critical and non-critically ill patients was performed with the Chi-squared contingency tables for categorical data (p -value ≤ 0.05 was considered a statistically significant difference). Minimum spanning trees were constructed for all isolates using the MST tool (miru-vntr.org).

Based on the documented risk factors, forty-five of our initial set of sixty-five patients (69%) could be classified according to TB severity at the moment of ICU admission into three groups (low, moderate and high severity). Most ICU admissions correspond to moderate to high severity TB (86.6%): low (13.4%), moderate (40.0%), and high risk (46.6%) (Suppl. Fig. 1)¹.

Supplementary Figure 1 shows the main characteristics of TB patients admitted to an ICU including demographic

Table 1A *Mycobacterium tuberculosis* lineages in critically ill and community patients.

Lineages	Critically ill patients, n (%)		Community patients, n (%)		p-value ^b
EAI	0 (0.0)		1 (1.0)		0.03
Haarlem	32 (53.3)		33 (34.7)		
LAM10	5 (8.3)	27 (45.0)	18 (18.9)	57 (60.0)	
LAM3 and 9	22 (36.7)	LAM ^a	39 (41.1)	LAM ^a	
S	1 (1.7)		1 (1.0)		
Others	0 (0)		3 (3.3)		
Total	60 (100)		95 (100)		

^a Corresponds to the sum of genotypes LAM10, LAM9 and LAM3 in critically ill and community patients respectively.

^b Chi square comparing ICU vs community TB patients.

Table 1B *Mycobacterium tuberculosis* lineage comparison in pulmonary community patients with unilateral or bilateral TB compromise.

Lineages	Community unilateral, n (%)		Community bilateral, n (%)		p-value ^b
Haarlem	14 (32.6)		20 (51.3)		ns
LAM10	20 (46.5)	27 (62.8)	10 (25.6)	17 (43.5)	
LAM3 and 9	7 (16.3)	LAM ^a	7 (17.9)	LAM ^a	
Others	2 (4.6)		2 (5.1)		
Total	43 (100.0)		39 (100.0)		

^a Corresponds to the sum of genotypes LAM10, LAM9 and LAM3 in critically ill and community patients respectively.

^b Chi-square comparing Unilateral vs Bilateral pulmonary compromise. ns = non-significant.

data, bilateral pulmonary compromise, comorbidities, organ dysfunctions, relevant laboratory findings, classification according to a tuberculosis severity score¹, and ICU mortality. In brief, patients were relatively young with male predominance. Bilateral pulmonary involvement was present in 44%, and HIV coinfection in 22% of the cases. Poor nutritional status was present in 76%. Respiratory and cardiovascular failure were the most frequent organ failures, and mechanical ventilation was implemented in 74% of the patients. Only 13.3% had a low tuberculosis risk severity score, while a moderate to high score was observed in 86.6% of these patients. Global mortality in ICU was 62% considering all patients (n=60) and reached 71.8% considering only high-to-moderate severity TB patients (n=39).

Among the ICU *M. tuberculosis* isolates, strains clustered into five main sub-lineages (Table 1A). Except for one particular case, all sub-lineages belong to Lineage 4 of *M. tuberculosis*. Typing of critical care patients reveals the Haarlem family as the most prominent in these samples (53.3%), followed by the LAM family (45.0%). On the contrary, LAM strains are more represented among community TB isolates (60.0%), followed by the Haarlem strains (34.7%), a significant statistical difference being observed when comparing these two populations ($p < 0.05$).

It is interesting to observe that the Haarlem family was more frequent in patients with bilateral TB (51.3%) versus unilateral TB (32.6%) in community patients (Table 1B). Although the observed difference was not statistically significant, it could indicate a more aggressive form of the disease caused by the Haarlem lineage. This hypothesis needs to be corroborated and could explain the high representation of the Haarlem genotype among critically ill patients.

More detailed analyses of typing results were performed analyzing the minimum spanning tree generated with the online tool MST (miru-vnrplus.org). Fourteen clonal complexes were obtained, community and critical isolates could be detected in each cluster (Fig. 1A and Supplementary Table 2). The biggest cluster comprises 44 isolates (22 of them – 9 ICU and 13 community samples – with the same MIRU pattern belonging to the Haarlem genotype (Fig. 1B)). Finally, 24 community samples and 10 ICU samples remain unclustered.

When analyzing the clonal complexes with more than six isolates (n=8), we could observe strains isolated during the whole studied period (Suppl. Table 2). This phenomenon also occurs when analyzing at group level. No clonal complexes were associated with a particular isolation year that could be due to a particular outbreak.

We investigated the possible association of observed TB genotypes with ICU patient's comorbidities.

A closer look into critically ill patients is shown in Table 2, comparing demographic data and some comorbidities such as drug abuse, HIV, COPD, and malnutrition, between the main represented strains (Haarlem and LAM families). We did not find any significant differences among comorbidities between the genotype groups.

Comparing organ dysfunctions observed among ICU patients (with a low to high severity score) between the different genotypes, we found that patients with the Haarlem genotypes showed hepatic dysfunction more frequently than patients with LAM ($p = 0.04$) (Table 2). The mortality observed in these patients was not statistically related to the *M. tuberculosis* genotype (Table 2), and no significant association between the outcome of patients with differ-

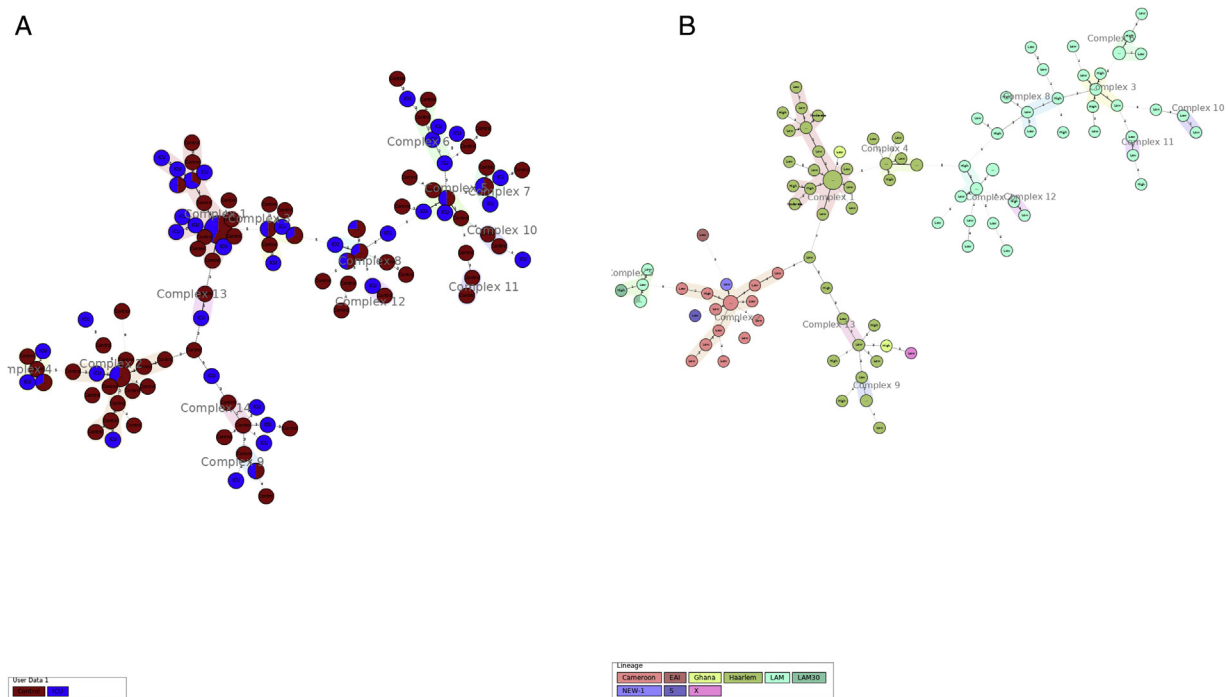


Figure 1 Minimum spanning tree cluster analysis. (A) Samples in red correspond to ICU samples; samples in blue correspond to community samples. Samples of both groups were present in all clusters. (B) Same analysis colored by lineage. LAM and Haarlem lineages correspond to the most frequent isolates.

Table 2 Demographic data, comorbidities, and overall outcomes comparing the Haarlem and LAM families in ICU patients with moderate to high severity score.

	Haarlem n = 32 (%)	LAM n = 27 (%)	p-value (chi-square test)
<i>Age</i>	41 ± 15	38 ± 14	ns
<i>APACHE II</i>	18 ± 11	16 ± 9	ns
<i>Male sex%</i>	27 (84.3)	17 (62.2)	0.05
<i>Mechanical ventilation</i>	23 (71.8)	23 (85.1)	ns
<i>Comorbidities</i>			
Drug abuse	12 (37.5)	10 (37.0)	ns
HIV coinfection	8 (25.0)	6 (22.2)	ns
COPD	4 (12.5)	5 (18.5)	ns
Malnutrition	4 (12.5)	5 (18.5)	ns
<i>Organ dysfunctions</i>			
Cardiovascular	18 (56.3)	16 (59.3)	ns
Renal	8 (25.0)	6 (22.2)	ns
Hepatic	9 (28.2)	2 (7.4)	0.04
ARDS	25 (78.2)	25 (92.5)	ns
ICU stay (days) ^a	9 ± 9	15 ± 15	ns
ICU-mortality	20 (62.5)	16 (59.2)	ns

The values represent the percentage or mean ± SD.

COPD = chronic obstructive pulmonary disease, ARDS = acute respiratory distress syndrome. ns: non significant.

^a Considering only patients who survived.

ent lineages was found. As far as we know, this is the first communication relating clinical and molecular epidemiology in critically ill patients with severe TB. Furthermore, we were able to compare the main TB lineages that circulate both in the community and critical care setting, studying

the association between these genotypes with clinical outcomes.

The principal finding showed that lineages belong to the Haarlem and LAM families in both studied populations, but observing a statistically significant difference between the

proportions of each family among these two populations. In addition, we were able to perform a lineage comparison considering the clinical outcome in community patients.

Although, the genotype information obtained with MIRU and spoligotyping is partial (and WGS analysis could shed light about genome implications in clinical outcome), the data presented in this work suggest a more significant contribution of host factors related to the severity of the disease.

In terms of ICU mortality, neither the LAM nor the Haarlem families showed higher virulence. Factors contributing to death in the present study were more likely related to host comorbidities (in particular, drug abuse, poor nutritional status, and lack of access to health care facilities).

Although the presented series in our study is one of the largest reported^{5,6,13}, the limited number of patients enrolled warrants a more robust statistical analysis. The study of cases should continue to add more information leading to improve the understanding of the correlation between TB lineages and virulence.

The results presented in this work represent a starting point, an in-depth study based on genomes could contribute to better understand the virulence observed in these strains and could help to improve the prognosis of these critically ill patients.

Financial support

This work was supported by grant FSS_2_2011_1_6850 (Fondo Sectorial de Salud, Agencia Nacional de Investigación e Innovación [ANII]). FOCEM - Fondo para la Convergencia Estructural del Mercosur (COF 03/11).

G.G., N.N., J.H. and C.R. are researchers from the Sistema Nacional de Investigadores (ANII), Montevideo, Uruguay.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ram.2021.02.011.

References

- Bastos HN, Osório NS, Castro AG, Ramos A, Carvalho T, Meira L, Araújo D, Almeida L, Boaventura R, Fragata P, Chaves C, Costa P, Portela M, Ferreira I, Magalhães SP, Rodrigues F, Sarmiento-Castro R, Duarte R, Guimarães JT, Saraiva M. A prediction rule to stratify mortality risk of patients with pulmonary tuberculosis. *PLoS ONE*. 2016;11:e0162797.
- Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, Allix C, Aristimuño L, Arora J, Baumanis V, Binder L, Cafrune P, Cataldi A, Cheong S, Diel R, Ellermeier C, Evans JT, Fauville-Dufaux M, Ferdinand S, De Viedma DG, Garzelli C, Gazzola L, Gomes HM, Gutierrez MC, Hawkey PM, Van Helden PD, Kadi-val GV, Kreiswirth BN, Kremer K, Kubin M, Kulkarni SP, Liens B, Lillebaek T, Ho ML, Martin C, Martin C, Mokrousov I, Narvskaja O, Yun FN, Naumann L, Niemann S, Parwati I, Rahim Z, Rasolof-Razanamparany V, Rasolonavalona T, Rossetti ML, Rüsck-Gerdes S, Sajduda A, Samper S, Shemyakin IG, Singh UB, Somoskovi A, Skuce RA, Van Soolingen D, Streicher EM, Suffys PN, Tortoli E, Tracevska T, Vincent V, Victor TC, Warren RM, Sook FY, Zaman K, Portaels F, Rastogi N, Sola C. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol*. 2006;6:23.
- Cannas A, Mazzarelli A, Caro A, Di, Delogu G, Girardi E. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains: a fundamental tool for tuberculosis control and elimination. *Infect Dis Rep*. 2016;8:38–42.
- Coitinho C, Greif G, Robello C, van Ingen J, Rivas C. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex by polymerase chain reaction of Exact Tandem Repeat-D fragment from mycobacterial cultures. *Int J Mycobacteriol*. 2012;1:146–8.
- Duro RP, Figueiredo Dias P, Ferreira AA, Xerinda SM, Lima Alves C, Sarmiento AC, Dos Santos LC. Severe tuberculosis requiring intensive care: a descriptive analysis. *Crit Care Res Pract*. 2016:2017. <https://www.hindawi.com/journals/ccrp/2017/9535463/> [online].
- Erbes R, Oettel K, Raffenberg M, Mauch H, Schmidt-loanas M, Lode H. Characteristics and outcome of patients with active pulmonary tuberculosis requiring intensive care. *Eur Respir J*. 2006;27:1223–8.
- Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, De Jong BC, Narayanan S, Nicol M, Niemann S, Kremer K, Gutierrez MC, Hilty M, Hopewell PC, Small PM. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:2869–73.
- Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, Van Soolingen D. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:843–9.
- Gutierrez MC, Ahmed N, Willery E, Narayanan S, Hasnain SE, Chauhan DS, Katoch VM, Vincent V, Loch C, Supply P. Predominance of ancestral lineages of *Mycobacterium tuberculosis* in India. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:1367–74.
- Lanoix JP, Gaudry S, Flicoteaux R, Ruimy R, Wolff M. Tuberculosis in the intensive care unit: a descriptive analysis in a low-burden country. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2014;18:581–7.
- Passi NN, Buckley J. Tuberculosis on the intensive care unit. *Br J Hosp Med*. 2018;79:142–7.
- Rutaihua LK, Sasamalo M, Jaleco A, Hella J, Kingazi A, Kamwela L, Kingalu A, Malewo B, Shirima R, Doetsch A, Feldmann J, Reinhard M, Borrell S, Brites D, Reither K, Doulla B, Fenner L, Gagneux S. Insights into the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Tanzania. *PLoS ONE*. 2019;14:e0206334.
- Tatar D, Senol G, Kirakli C, Edipoglu O, Cimen P. Contributing factors to mortality rates of pulmonary tuberculosis in intensive care units. *J Chinese Med Assoc*. 2018;81:605–10.
- Varghese B, Enani M, Alrajhi A, Al Johani S, Albarak A, Althawadi S, Elkhizzi N, Alghafli H, Shoukri M, Al-Hajj S. Impact of *Mycobacterium tuberculosis* complex lineages as a determinant of disease phenotypes from an immigrant rich moderate tuberculosis burden country. *Respir Res*. 2018;19:259.
- World Health Organization. Global tuberculosis report; 2020. https://www.who.int/tb/publications/global_report/en [accessed 07.11.20].

Species Distribution and Isolation Frequency of Nontuberculous Mycobacteria, Uruguay

Gonzalo Greif, Cecilia Coitinho, Jakko van Ingen, Carlos Robello

Nontuberculous mycobacteria (NTM) increasingly are recognized as opportunistic pathogens of humans. NTM species distribution is well documented in Europe and North America, but data from other regions are scarce. We assessed NTM isolation frequency and species distribution in Uruguay during 2006–2018.

Nontuberculous mycobacteria (NTM) are comprised of >150 species (1) and are increasingly recognized as opportunistic pathogens (2). In addition, frequency of disease-causing NTM isolation has been rising in many settings (3,4). The exact epidemiology of NTM pulmonary disease, the most common manifestation in adults (3), has been difficult to determine because reporting is not mandatory in most countries and identification of true disease is often difficult (5).

The distribution of NTM species isolated from human clinical samples varies greatly by region (6). In South America, data on NTM isolation frequencies are available for São Paulo and Rio de Janeiro, Brazil (7–9) and Buenos Aires, Argentina (6). Because clinical and laboratory observations suggested an emergence of NTM isolates, we conducted a retrospective study of isolation frequency of NTM in Uruguay.

The Study

We conducted a retrospective study of data on all NTM isolates identified at the Comisión Honoraria de Lucha Anti-Tuberculosis (Montevideo, Uruguay), the national tuberculosis reference laboratory, during January 2006–December 2018. The laboratory

Author affiliations: Institut Pasteur Montevideo, Montevideo, Uruguay (G. Greif, C. Robello); Comisión Honoraria de Lucha Anti-Tuberculosa y Enfermedades Prevalentes, Montevideo (C. Coitinho); Radboud University Medical Center, Nijmegen, the Netherlands (J. van Ingen); Universidad de la República, Montevideo (C. Robello)

Article DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2605.191631>

receives samples from all suspected tuberculosis (TB) cases across the country and performs universal acid-fast bacillus smear testing and solid culture in Löwenstein-Jensen and Ogawa egg-based media as a part of routine diagnostic testing. We abstracted basic patient demographic information and NTM identification results from the laboratory databases.

Phenotypic characterization of isolated NTM was performed by using biochemical methods, and complementary genotyping identification was introduced in 2012 by using GenoType Mycobacterium CM (Hain Lifescience GmbH, <https://www.hain-lifescience.de>). In 2016, the laboratory included GenoType Mycobacterium AS (Hain Lifescience GmbH) in its pipeline and retrospectively identified previously unidentified isolates.

For comparison, we also collected data on the number of culture-positive TB cases during the study period from the laboratory databases. We used official population information from the National Institute of Statistics Uruguay (Instituto Nacional de Estadística, <http://www.ine.gub.uy>) to calculate NTM incidence (Appendix 1, <https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/26/5/19-1631-App1.xlsx>).

During 2006–2018, a total of 255 NTM isolates were collected from pulmonary and extrapulmonary samples from 204 patients, 143 male and 61 female, in Uruguay (Table 1). Most (147/255; 57.6%) isolates identified were members of the *Mycobacterium avium* complex (MAC), which includes *M. intracellulare* and *M. avium*; 21 (8.2%) were *M. kansasii*; 15 were *M. goodii* (5.9%); and 12 were *M. peregrinum* (4.7%) (Table 2). We observed an increase in NTM isolation frequency and an increase in TB cases during 2011–2018 (Figure 1, panel A). We also calculated an age-adjusted isolation frequency to determine population aging effect (Figure 1, panel B).

Among 204 cases, 23 patients had >1 NTM-positive isolate 6 months apart, and 13 had positive cultures for >2 years. Patients >50 years of age (mean

Table 1. Specimen sources for isolation of nontuberculous mycobacteria, Uruguay*

Specimen source	No. (%)
Pulmonary	
Sputum	170 (66.6)
Bronchoalveolar lavage	18 (7.0)
Bronchoalveolar secretion†	8 (3.1)
Lung biopsy	6 (2.3)
Pleural fluid	3 (1.2)
Ear, nose, throat aspirate	2 (0.8)
Puncture fluid	3 (1.2)
Total	210 (82.3)
Extrapulmonary	
Blood culture	15 (5.9)
Myelocyte culture	9 (3.5)
Skin or soft tissue abscess	4 (1.6)
Urine	1 (0.4)
Feces	2 (0.8)
Gastric lavage	1 (0.4)
Ganglion biopsy	3 (1.2)
Ascites fluid	3 (1.2)
Total	38 (14.9)
Multiple isolation sources‡	3 (1.2)
Missing data	4 (1.6)

*The data include isolates from the same patient over time.
 †Includes tracheal aspirations.
 ‡Includes pulmonary and nonpulmonary samples of the same patient.

52 years of age) were more likely to have prolonged culture-positivity, a statistically significant difference from patients with a single positive culture (mean 42.6 years of age; $p = 0.0099$). Most (7/13; 53.8%) prolonged infections were caused by *M. intracellulare*, and 4 prolonged cases remained NTM-positive for ≤ 6 years, including 2 infections with *M. intracellulare* and 1 each with *M. kansasii* and *M. heckeshornense*. Most (10/13; 76.9%) prolonged cases were detected in pulmonary isolates.

Only 4 (1.9%) cases showed disseminated infections in isolates obtained from hemoculture, bone marrow culture, ganglion biopsy, feces, urine, or sputum of the same patient. Among the 4 disseminated infections, *M. avium* was isolated from 2 cases, *M. genavense* from 1 case, and *M. intracellulare* from 1 case.

The incidence of NTM in Uruguay increased from 0.33 cases/100,000 inhabitants in 2006 to 1.57 cases/100,000 inhabitants to 2018 (Figure 1, panel A). In 2018, the incidence of NTM was 2.73/100,000 inhabitants in the north, which has only 16.72% of the total population of the country. In the south, where 83.28% of the population lives, the incidence was much lower, 1.34 cases/100,000 inhabitants. Culture-positive TB cases showed a reverse tendency with statistically significant differences. The incidence rate for TB was higher in the south, 30.01 cases/100,000 inhabitants, and lower in the north, 21.50 cases/100,000 inhabitants (Figure 2).

During the period studied, we observed a 4-fold increase in the NTM isolation rate (Appendix 1). Implementation of new detection techniques during this timeframe could account for part of the increase (10). However, we noted a >2 -fold increase (2.49) in number of isolates recorded during 2017–2018, when no laboratory protocol changes were introduced, suggesting the NTM incidence is rising in Uruguay (Appendix 1).

Rivero-Lezcano et al. (10) suggested changes in the pathogen and an aging population could explain the rising incidence of NTM isolation and

Table 2. Nontuberculous mycobacteria species isolated in Uruguay, 2006–2018*

Species	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	Total	% Total
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	6	5	2	2	4	3	6	3	6	13	9	10	17	86	33.7
<i>M. avium</i>	4	0	1	1	7	2	3	2	5	6	3	6	21	61	23.9
<i>M. kansasii</i>	0	0	0	1	2	3	2	2	5	1	2	2	1	21	8.2
<i>M. gordonae</i>	2	1	0	0	0	0	0	2	4	2	0	2	2	15	5.9
<i>M. peregrinum</i>	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	3	2	2	12	4.7
<i>M. chelonae</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	0	2	8	3.1
<i>M. fortuitum</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	1	2	2	8	3.1
NTM, no species determinant	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	0	5	2.0
<i>M. genavense</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	4	1.6
<i>M. avium</i> MTBC†	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	3	1.2
<i>M. intracellulare</i> MTBC†	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	3	1.2
<i>M. lentiflavum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	4	1.6
<i>M. scrofulaceum</i>	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	1	4	1.6
<i>M. simiae</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	3	1.2
<i>M. abscessus</i>	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	3	1.2
<i>M. heckeshornense</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	0.8
<i>M. xenopi</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0.8
Other species‡	0	0	0	0	0	0	0	3	0	4	0	1	3	11	4.3
Total	12	7	4	5	15	12	14	19	26	33	27	28	53	255	100.0

*MTBC, *Mycobacterium tuberculosis* complex; NTM, nontuberculous mycobacterium.

†Mixed infections.

‡Other species included 1 isolate each of *M. arupense*, *M. asiaticum*, *M. koreense*, *M. shimodei*, *M. interjectum*, *M. marinum* and *M. malmoense*, and mixed infections of *M. avium*–*M. intracellulare*, *M. gordonae*–*M. chelonae*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare*–MTBC.

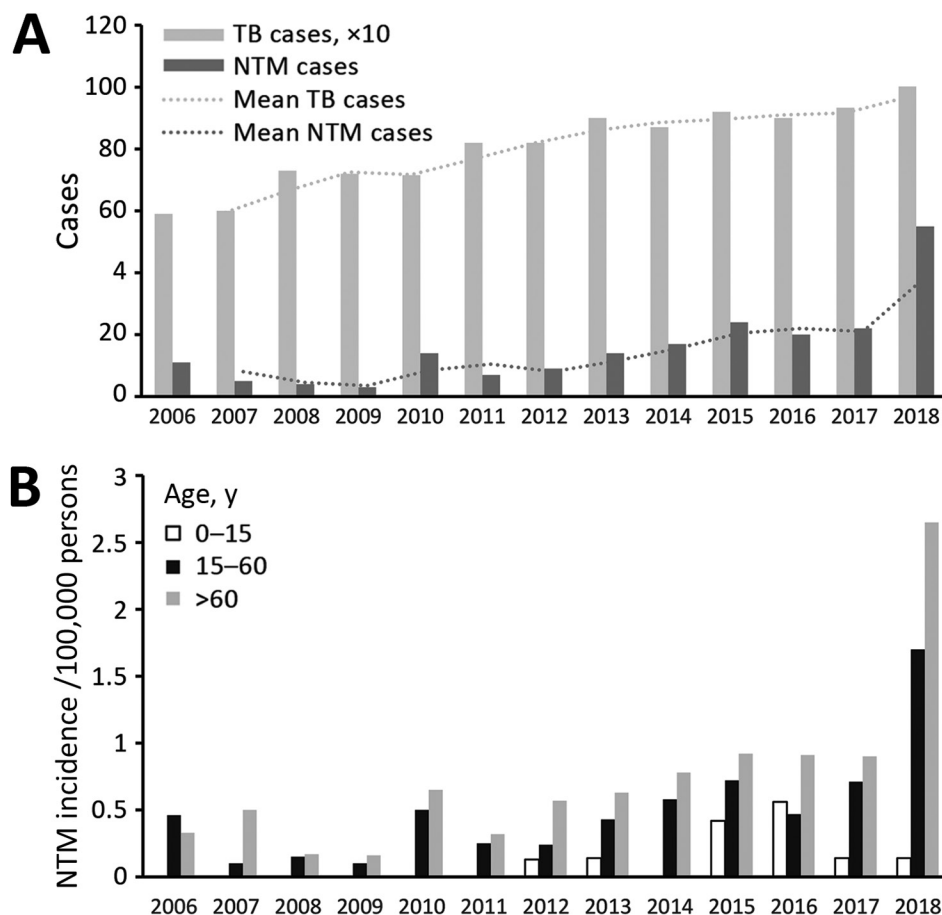


Figure 1. Number of cases of nontuberculous mycobacteria and tuberculosis, Uruguay, 2006–2018. A) NTM and TB cases by year. B) NTM incidence adjusted by age range and year. NTM, nontuberculous mycobacteria; TB, tuberculosis.

disease. From 2017 to 2018, we observed a higher increase in NTM incidence (2.94 cases/100,000 persons) among persons >60 years of age compared with persons 15–60 years of age (2.39 cases/100,000 persons) (Figure 1, panel B). However, we noted that the age composition of the population remained stable over time (Appendix 1), suggesting other factors are driving increases in NTM isolation rates.

MAC is reported to be the most frequently isolated NTM species in all continents (3), but we observed a different species distribution than previously reported for South America. We saw a higher prevalence of *M. intracellulare* (33.7% of isolates) than *M. avium* (23.9% of isolates) (Table 2). We found species not previously reported in Latin America, including *M. xenopi* and *M. arupense*, and *M. malmoense*, which typically is found in northern Europe (11). We also found *M. parakoreense*, for which only 2 cases are reported in the literature, 1 case in 2013 isolated from a single clinical sample (12) and another in Africa (13). In addition, we noted 2 cases of *M. heckeshornense*, a species previously reported by our group (14).

We noted prolonged positivity in 6% (13/204) of NTM cases. MAC was responsible for most (69%) prolonged culture positives and *M. kansasii* was responsible for 15% of prolonged positivity.

We believe the differences observed in NTM isolation rates between regions of Uruguay could be explained by climate factors. The higher temperatures and increased rainfall in the north could favor the incidence ambient pathogens (Appendix 2, <https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/26/5/19-1631-App2.pdf>). We also cannot disregard differences associated with other factors, such as the age of the population.

Our study has several limitations. First, the public health system of Uruguay only registers *M. tuberculosis*; clinical data of NTM patients are difficult to obtain. In addition, the GenoType AS assay used to identify NTM does not detect all NTM species; including genomic sequencing-based identification methods would improve detection in the future. Identification of NTM species is crucial for determining appropriate clinical and antimicrobial treatment for pulmonary NTM, which are dependent on the characteristics of the species (8).

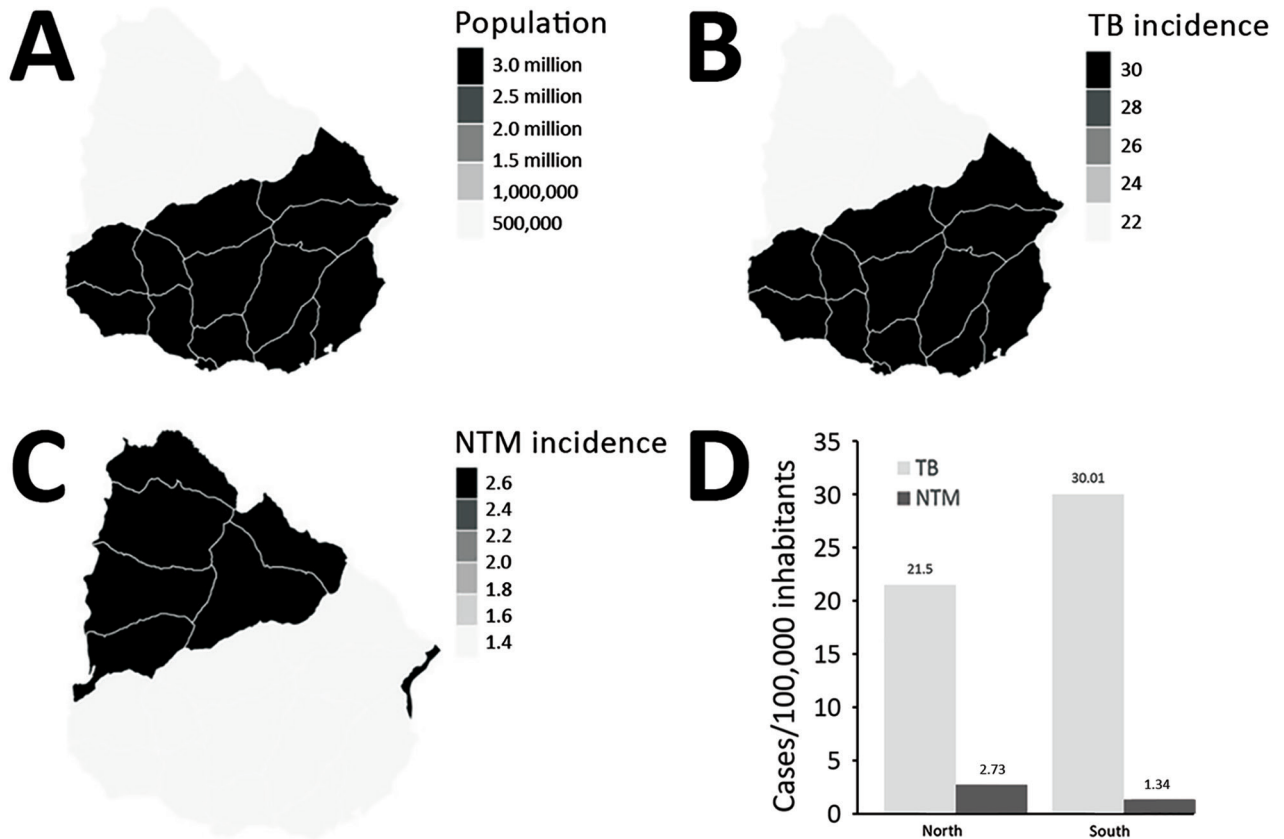


Figure 2. Distribution of cases of tuberculosis and nontuberculous mycobacteria by region and population density in 2018, Uruguay. A) Population density of north versus south regions of Uruguay. B) Incidence of TB cases in 2018. C) Incidence of NTM cases in 2018. D) TB and NTM incidence by region. Even though the population density in the north is much lower than that in the south, the north has a higher incidence of NTM than the south. NTM, nontuberculous mycobacteria; TB, tuberculosis.

Conclusions

Our findings indicate that rate of NTM have risen nearly 5-fold (4.79) in Uruguay, from 0.33 cases/100,000 inhabitants in 2006 to 1.57 cases/100,000 inhabitants in 2018. The species distribution largely aligns with existing data from elsewhere in South America, which demonstrates a predominance of MAC. Prolonged culture positivity and various isolation sites sources suggest that NTM disease is prevalent in Uruguay and warrants further studies to optimize diagnosis and treatment.

Acknowledgments

We thank Carlos Rivas for his support and efforts to preserve nontuberculous mycobacteria data at the Comisión Honoraria de Lucha Anti-Tuberculosis.

G.G. and C.R. are supported by the Sistema Nacional de Investigadores, Uruguay.

About the Author

Dr. Greif is a molecular biologist at the Institut Pasteur Montevideo, Montevideo, Uruguay. His research interests include developing molecular methods for diagnosing mycobacteria.

References:

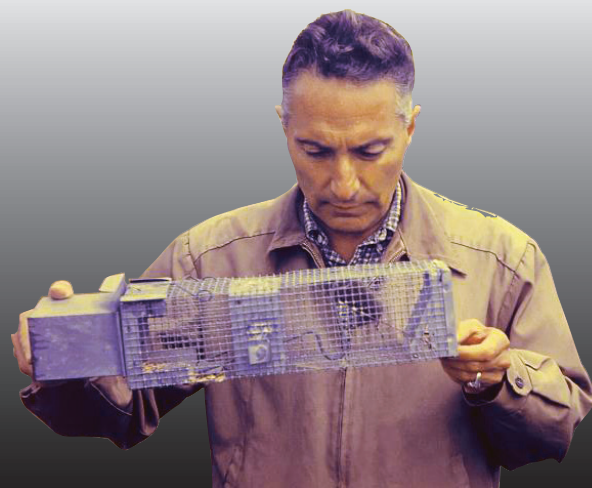
1. Tortoli E. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27:727–52. <https://doi.org/10.1128/CMR.00035-14>
2. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al.; ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee; American Thoracic Society; Infectious Disease Society of America. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175:367–416. <https://doi.org/10.1164/rccm.200604-571ST>
3. Zweijpenning SMH, Ingen JV, Hoefsloot W. Geographic distribution of nontuberculous mycobacteria isolated from clinical specimens: a systematic review.

- Semin Respir Crit Care Med. 2018;39:336–42. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1660864>
4. Schiff HF, Jones S, Achaiah A, Pereira A, Stait G, Green B. Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated from respiratory specimens: seven year experience in a UK hospital. *Sci Rep*. 2019;9:1730. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37350-8>
 5. Prevots DR, Loddenkemper R, Sotgiu G, Migliori GB. Nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: an increasing burden with substantial costs. *Eur Respir J*. 2017;49:1700374. <https://doi.org/10.1183/13993003.00374-2017>
 6. Hoefsloot W, van Ingen J, Andrejak C, Ångeby K, Bauriaud R, Bemer P, et al.; Nontuberculous Mycobacteria Network European Trials Group. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. *Eur Respir J*. 2013;42:1604–13. <https://doi.org/10.1183/09031936.00149212>
 7. Bensi EP, Panunto PC, Ramos MC. Incidence of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria, differentiated by multiplex PCR, in clinical specimens of a large general hospital. *Clinics (São Paulo)*. 2013;68:179–84. [https://doi.org/10.6061/clinics/2013\(02\)OA10](https://doi.org/10.6061/clinics/2013(02)OA10)
 8. Marques LRM, Ferrazoli L, Chimara É. Pulmonary nontuberculous mycobacterial infections: presumptive diagnosis based on the international microbiological criteria adopted in the state of São Paulo, Brazil, 2011–2014 [in Portuguese]. *J Bras Pneumol*. 2019;45:e20180278. <https://doi.org/10.1590/1806-3713/e20180278>
 9. de Mello KGC, Mello FC, Borga L, Rolla V, Duarte RS, Sampaio EP, et al. Clinical and therapeutic features of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Brazil, 1993–2011. *Emerg Infect Dis*. 2013;19:393–9.
 10. Rivero-Lezcano OM, González-Cortés C, Mirsaeidi M. The unexplained increase of nontuberculous mycobacteriosis. *Int J Mycobacteriol*. 2019;8:1–6. https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_18_19
 11. Jankovic M, Samarzija M, Sabol I, Jakopovic M, Katalinic Jankovic V, Zmak L, et al. Geographical distribution and clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria in Croatia. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2013;17:836–41. <https://doi.org/10.5588/ijtld.12.0843>
 12. Kim BJ, Hong SH, Yu HK, Park YG, Jeong J, Lee SH, et al. *Mycobacterium parakoreense* sp. nov., a slowly growing non-chromogenic species related to *Mycobacterium koreense*, isolated from a human clinical specimen. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013;63:2301–8. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.045070-0>
 13. Chin'ombe N, Muzividzi B, Munemo E, Nziramasanga P. Molecular identification of nontuberculous mycobacteria in humans in Zimbabwe using 16S ribosequencing. *Open Microbiol J*. 2016;10:113–23. <https://doi.org/10.2174/1874285801610010113>
 14. Coitinho C, Greif G, van Ingen J, Laserra P, Robello C, Rivas C. First case of *Mycobacterium heckeshornense* cavitory lung disease in the Latin America and Caribbean region. *New Microbes New Infect*. 2015;9:63–5. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.12.003>

Address for correspondence: Gonzalo Greif, Laboratorio de Interacción Hospedero-Patógeno, Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur Montevideo, Mataojo 2020, Montevideo, Uruguay; email: gonzalo.greif@pasteur.edu.uy

EID Podcast: Epidemiology of Human Plague in the United States, 1900–2012

Plague is a globally distributed, zoonotic disease caused by the bacterium *Yersinia pestis*. In the late 1890s, rat-infested steamships introduced the disease into the continental United States. The first documented autochthonous human infection occurred in the Chinatown section of San Francisco, California, in March of 1900. Cases were soon reported in other port cities, including New Orleans, Galveston, Seattle, and Los Angeles. Along the Pacific Coast, infection spread from urban rats to native rodent species, and by the 1950s, *Y. pestis* had spread eastward to reach western portions of the Dakotas, Nebraska, Kansas, Oklahoma, and Texas. This distribution has remained static for more than 60 years, presumably the result of climatic and ecologic factors that limit further spread. Although poorly defined, these factors may be related to the ecology of vector species rather than that of rodent hosts.



Visit our website to listen:
[http://www2c.cdc.gov/podcasts/
player.asp?f=8635764](http://www2c.cdc.gov/podcasts/player.asp?f=8635764)

**EMERGING
INFECTIOUS DISEASES®**

First case of *Mycobacterium heckeshornense* cavitary lung disease in the Latin America and Caribbean region

C. Coitinho¹, G. Greif², J. van Ingen³, P. Laserra¹, C. Robello^{2,4} and C. Rivas¹

1) Comisión Honoraria de Lucha Anti-Tuberculosa y Enfermedades Prevalentes (CHLA-EP), 2) Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay, 3) Department of Medical Microbiology, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands and 4) Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Abstract

A case of cavitary pulmonary disease caused by *Mycobacterium heckeshornense* in Uruguay is described. This is the first case reported in the Latin America and Caribbean region, showing that this species is a worldwide opportunistic human pathogen.

New Microbes and New Infections © 2015 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

Keywords: Epidemiology, infection, mycobacterium, *Mycobacterium heckeshornense*, pulmonary

Original Submission: 30 October 2015; **Accepted:** 9 December 2015

Article published online: 18 December 2015

Corresponding author: G. Greif, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay
E-mail: gonzalo.greif@pasteur.edu.uy

In July 2013 a 53-year-old white homeless man with a history of alcoholism was admitted to the hospital with long-standing cough, fever and fatigue. Physical examination revealed malnutrition with severe weight loss, dyspnea and decreased lung sounds primarily in the upper lobes. Chest radiograph and computed tomographic imaging (Fig. 1) revealed bilateral upper lobe infiltrates with cavitation. Haematological analysis revealed a hemoglobin level of 9.8 g/dL and a leukocyte count of $6.9 \times 10^9/L$. HIV serology was negative. With a presumptive diagnosis of tuberculosis, two serial sputum samples and a bronchoalveolar lavage sample were sent to the national tuberculosis reference laboratory. All direct smears (stained with Auramine O and Ziehl-Neelsen) were positive for acid-fast bacilli. Antituberculosis treatment was started, with isoniazid, rifampicin, pyrazinamide and ethambutol (HRZE) provided according to the guidelines of the National Program of Tuberculosis of Uruguay. The bronchoalveolar lavage sample was decontaminated with the N-acetyl-L-cysteine–sodium hydroxide (NALC-NaOH) method and inoculated into mycobacterium growth indicator tubes (MGIT; BD Biosciences,

Sparks, MD, USA) automated liquid culture system. After 26 days of incubation, the MGIT culture flagged positive; Ziehl-Neelsen stain of liquid culture was positive for acid-fast bacilli, and immunochromatographic test for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex (TBC ID; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) was negative. Cells were pelleted and DNA extracted. The GenoType Mycobacterium CM (common mycobacteria) and AS (additional species) assays (Hain Lifesciences, Nehren, Germany) for identification of nontuberculous mycobacteria were performed. The results were positive for *M. heckeshornense*.

Subcultures on Ogawa medium, as well as the solid cultures from the two sputum samples, yielded small, hemispheric, smooth and yellow-pigmented colonies after 4 weeks of incubation.

Phenotypic characterization was performed for all isolates (Table 1), and DNA was submitted to the Institut Pasteur at Montevideo for sequencing studies. To identify the isolates to the species level, the complete 16S rDNA gene and a fragment of *hsp65* and *rpoB* genes were sequenced (GenBank accession numbers KP636957, KP636958 and KP636959, respectively). The DNA sequences obtained were compared with the GenBank/European Molecular Biology Laboratory sequence database. Gene sequencing unambiguously confirmed the identification of *M. heckeshornense* (100%

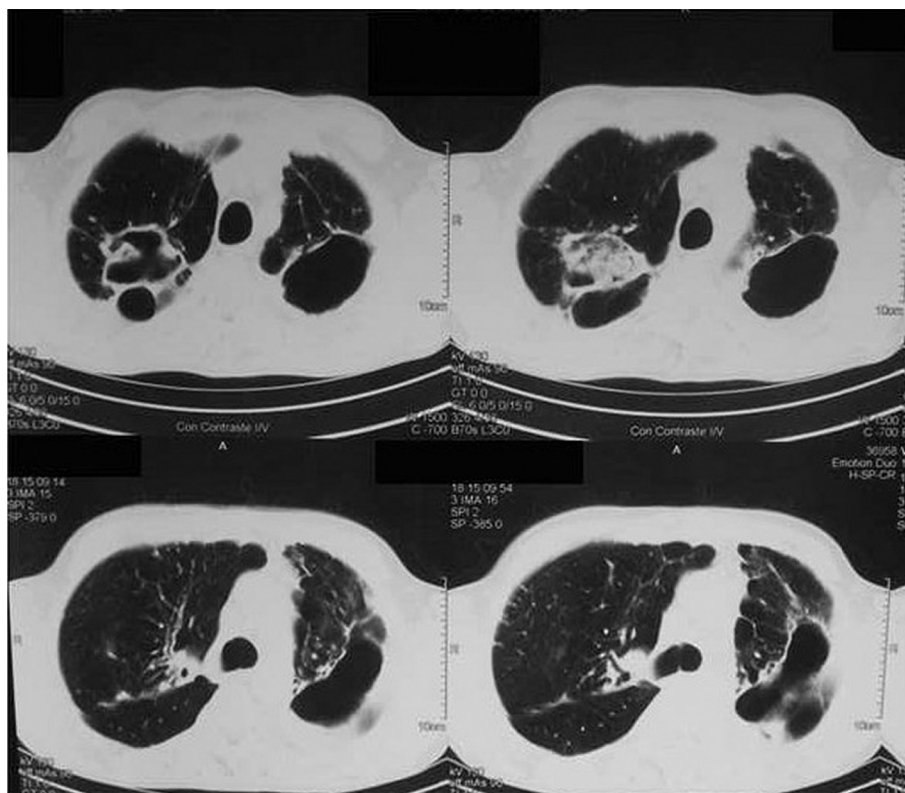


FIG. 1. Chest computed tomographic scan showing pulmonary infiltrates and cavities.

similarity with *M. heckeshornense* type strain sequences for all targets). With these clinical, radiologic and microbiologic findings, the patient met the American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America diagnostic criteria of nontuberculous mycobacterial lung disease [1]. Treatment was thus changed to isoniazid, rifampicin, ethambutol, levofloxacin and clarithromycin, all provided daily. Ethambutol had to be stopped owing to ocular toxicity. The patient improved clinically, and a regression of the lesions was observed radiologically. After 12 months of treatment with the

macrolide-containing regimen, the patient had converted to negative cultures, and treatment was stopped. After 12 months of follow-up, his disease is clinically and radiologically stable and culture negative.

M. heckeshornense was first reported in 2000 as a pathogenic, slowly growing scotochromogenic mycobacterium, phylogenetically related to *Mycobacterium xenopi*, that caused a bilateral cavitary lung disease in an immunocompetent patient [2]. Since then, a limited number of cases were reported in humans, some of them involving severe pulmonary infections [3–5] often

TABLE 1. Phenotypic characteristics of isolates from Uruguay and isolates originally reported as *Mycobacterium heckeshornense* sp.

Feature	<i>Mycobacterium xenopi</i>	Isolates from Uruguay (n = 3)	Isolates of <i>M. heckeshornense</i> sp. nov. ^a		
			S369	S532	S504
Morphology	Smooth	Smooth	Smooth	Smooth	Smooth
Pigment	Scotochromogen	Scotochromogen	Scotochromogen	Scotochromogen	Scotochromogen
Growth rate	Slow	Slow	Slow	Slow	Slow
Growth at 37°C	+	+	+	+	+
Growth at 42°C	+	+	+	+	+
Niacin production	–	–	–	–	–
Nitrate reduction	–	–	–	–	–
Catalase (heat stable)	–/+	+	+	+	+
Arylsulfatase 3 days/14 days	+(weak)/+	+(weak)/+	–/–	–/–	–/–
Pyrazinamide	+	+	–	–	–
Tween 80 hydrolysis	–	–	–	–	–

^aIdentification number of isolates obtained by Roth *et al.* [5].

identified as *M. xenopi* and also involving extrapulmonary infections [6–12]. Furthermore, it was isolated from animal sources such as porcine lymph nodes [13] and from a domestic cat with a severe generalized infection [14]. This could indicate that this species is widely distributed in the environment. The new commercially available molecular biology methods can fast and precisely identify most common *Mycobacterium* species. In our case, we identified correctly *M. heckeshornense* using the Genotype CM/AS HAIN tests in 2 days.

The patient was treated with standard therapy (HRZE) for 2 months, until the diagnosis of *M. heckeshornense* was confirmed. In the absence of guidelines for the treatment of *M. heckeshornense* disease, the patient was treated with isoniazid, rifampicin, ethambutol, levofloxacin and clarithromycin. This led to prolonged culture conversion and no relapse 12 months after treatment cessation. In some patients [5,7], resolution was reached with surgical procedures. In our case, the extent of the pulmonary lesions and the general condition of the patient prevented this approach. Although *M. heckeshornense* is genetically related to *M. xenopi*, its pathogenicity is noticeably higher [4]. Cases have been reported in Asia, Europe and recently in Canada [7], showing that *M. heckeshornense* is an opportunistic pathogen present worldwide. This is the first case reported in Uruguay and the Latin America and Caribbean regions. A possible explanation of this fact is that in many countries of this region, tuberculosis disease is confirmed only by microscopy; culture and identification, particularly molecular identification, are not routinely done.

In summary, we describe a case of fibrocavitary *M. heckeshornense* pulmonary disease, the first of its kind described in the Latin America and Caribbean region. A treatment regimen of isoniazid, rifampicin, clarithromycin and levofloxacin led to symptomatic improvement. *M. heckeshornense* is a serious nontuberculous mycobacterial pathogen with a worldwide spread.

Acknowledgements

Partially funded by FOCEM (MERCOSUR Structural Convergence Fund), grant COF 03/11. GG, CR and CC are researchers from the Sistema Nacional de Investigadores (ANII), Uruguay.

Conflict of Interest

None declared.

References

- [1] Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:367–416.
- [2] Morimoto K, Kazumi Y, Maeda S, Yoshimori K, Yoshiyama T, Ogata H, et al. *Mycobacterium heckeshornense* lung infection that was diagnosed as *Mycobacterium xenopi* disease by DNA-DNA hybridization (DDH). *Intern Med* 2011;50(11):1251–3. Epub 2011 Jun 1.
- [3] Hisamoto A, Ozaki S, Sakugawa M, Komoto R, Tamaoki A, Miyake T, et al. [A possible case of pulmonary infection due to *Mycobacterium heckeshornense*]. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 2008;46:1019–23.
- [4] Jauregui F, Ios V, Marzouk P, Hornstein M, Picard B, Gutierrez MC, et al. *Mycobacterium heckeshornense*: an emerging pathogen responsible for a recurrent lung infection. *J Infect* 2007;54:e33–5.
- [5] Roth A, Reischl U, Schonfeld N, Naumann L, Emler S, Fischer M, et al. *Mycobacterium heckeshornense* sp. nov., a new pathogenic slowly growing *Mycobacterium* sp. causing cavitory lung disease in an immunocompetent patient. *J Clin Microbiol* 2000;38:4102–7.
- [6] Ahmed RA, Miedzinski LJ, Shandro C. *Mycobacterium heckeshornense* infection in HIV-infected patient. *Emerg Infect Dis* 2010;16:1801–3.
- [7] Chan WW, Murray MC, Tang P, Romney MG. *Mycobacterium heckeshornense* peritonitis in a peritoneal dialysis patient: a case report and review of the literature. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1262–4.
- [8] Elyousfi AA, Leiter JR, Goytan MJ, Robinson DB. *Mycobacterium heckeshornense* lumbar spondylodiskitis in a patient with rheumatoid arthritis receiving etanercept treatment. *J Rheumatol* 2009;36:2130–1.
- [9] Godreuil S, Marchandin H, Terru D, Le Moing V, Chammas M, Vincent V, et al. *Mycobacterium heckeshornense* tenosynovitis. *Scand J Infect Dis* 2006;38:1098–101.
- [10] McBride SJ, Taylor SL, Pandey SK, Holland DJ. First case of *Mycobacterium heckeshornense* lymphadenitis. *J Clin Microbiol* 2009;47:268–70.
- [11] Kazumi Y, Sugawara I, Wada M, Kimura K, Itono H. [Microbiologically identified isolates of *Mycobacterium heckeshornense* in two patients]. *Kekkaku* 2006;81:603–7.
- [12] van Hest R, van der Zanden A, Boeree M, Kremer K, Dessens M, Westenend P, et al. *Mycobacterium heckeshornense* infection in an immunocompetent patient and identification by 16S rRNA sequence analysis of culture material and a histopathology tissue specimen. *J Clin Microbiol* 2004;42:4386–9.
- [13] van Ingen J, Wisselink HJ, van Solt-Smits CB, Boeree MJ, van Soolingen D. Isolation of mycobacteria other than *Mycobacterium avium* from porcine lymph nodes. *Vet Microbiol* 2010;144:250–3.
- [14] Elze J, Grammel L, Richter E, Aupperle H. First description of *Mycobacterium heckeshornense* infection in a feline immunodeficiency virus-positive cat. *J Feline Med Surg* 2013;15:1141–4.

mycobacteria. Furthermore, limitations of our study include the single-centre design. Our observations may have been different if our NCFBr centre facilities were shared with our regional CF clinic. We therefore advocate further multicentre studies to delineate the cross-infection risks.



@ERSpublications

Cross-infection with *Pseudomonas aeruginosa* is rare in non-cystic fibrosis bronchiectasis

<http://ow.ly/sjvKz>

Anthony De Soya^{1,2}, Audrey Perry³, Amanda J. Hall⁴, Syba S. Sunny², Kathy E. Walton³, Nazim Mustafa⁵, Jane Turton⁵, Dervla T. Kenna⁵ and Craig Winstanley⁴

¹Institute of Cellular Medicine, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, ²Sir William Leech Centre for Respiratory Research and Freeman Hospital Adult Bronchiectasis Unit, Newcastle upon Tyne Hospitals NHS Foundation Trust, Newcastle upon Tyne, ³Dept of Medical Microbiology, Newcastle upon Tyne Hospitals NHS Foundation Trust, Newcastle upon Tyne, ⁴Institute of Infection and Global Health, University of Liverpool, Liverpool, and ⁵Antimicrobial Resistance and Healthcare Associated Infections Reference Unit, Public Health England, London, UK.

Correspondence: A. De Soya, Institute of Cellular Medicine, Sir William Leech Building, The Medical School, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, NE2 4HH, UK. E-mail: anthony.de-soya@ncl.ac.uk

Received: Sept 25 2013 | Accepted: Oct 16 2013 | First published online: Oct 31 2013

Support statement: A. De Soya acknowledges a Higher Education Funding Council for England senior lectureship and funding from the National Institute for Health Research Newcastle Biomedical Resource Centre for Ageing and Chronic Disease.

Conflict of interest: Disclosures can be found alongside the online version of this article at www.erj.ersjournals.com

References

- 1 Chalmers JD, Goeminne P, Aliberti S, *et al*. The Bronchiectasis Severity Index: an international derivation and validation study. *Am J Respir Crit Care Med* 2013 [In press DOI: 10.1164/rccm.201309-1575OC].
- 2 Emerson J, Rosenfeld M, McNamara S, *et al*. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2002; 34: 91–100.
- 3 Al-Aloul M, Crawley J, Winstanley C, *et al*. Increased morbidity associated with chronic infection by an epidemic *Pseudomonas aeruginosa* strain in CF patients. *Thorax* 2004; 59: 334–336.
- 4 Cheng K, Smyth RL, Govan JR, *et al*. Spread of β -lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. *Lancet* 1996; 348: 639–642.
- 5 Fothergill JL, Walshaw MJ, Winstanley C. Transmissible strains of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infections. *Eur Respir J* 2012; 40: 227–238.
- 6 Pasteur MC, Bilton D, Hill AT, *et al*. British Thoracic Society guideline for non-CF bronchiectasis. *Thorax* 2010; 65: Suppl. 1, i1–i58.
- 7 Stewart RM, Wiehlmann L, Ashelford KE, *et al*. Genetic characterization indicates that a specific subpopulation of *Pseudomonas aeruginosa* is associated with keratitis infections. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 993–1003.
- 8 Wiehlmann L, Wagner G, Cramer N, *et al*. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 8101–8106.
- 9 Turton JF, Turton SE, Yearwood L, *et al*. Evaluation of a nine-locus variable-number tandem-repeat scheme for typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1111–1116.
- 10 Martin K, Baddal B, Mustafa N, *et al*. Clusters of genetically similar isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from multiple hospitals in the UK. *J Med Microbiol* 2013; 62: 988–1000.

Eur Respir J 2014; 43: 900–903 | DOI: 10.1183/09031936.00167813 | Copyright ©ERS 2014

Rapidly progressing tuberculosis outbreak in a very low risk group

To the Editor:

We report an unusual tuberculosis (TB) outbreak, centred on a professional basketball team in Montevideo, Uruguay, a country with a low TB incidence (21 cases per 100 000). Uruguay has a relatively high income (2010 gross domestic product USD14 338 *per capita*), a low HIV prevalence (305 cases per 100 000) and a very low rate of multidrug-resistant TB (0.24%) [1]. In August 2008, a young male member of the basketball team was diagnosed with TB, with positive microscopic examination and Ziehl-Nielsen staining of a sputum sample (graded 1). Chest radiography indicated a bilateral pulmonary form with cavities. TB was bacteriologically confirmed 20 days later, with a *Mycobacterium tuberculosis* isolate pan-susceptible to antituberculous drugs. The patient was compliant with first-line treatment (2HRZ/4H₂R₂; 2 months daily

treatment with isoniazid, rifampicin and pyrazinamide followed by 4 months of twice weekly isoniazid and rifampicin) and was cured. However, following this index case six other team members, who were living at the same basketball clubhouse during the week, the brother of the index case, a team member's girlfriend and two other friends were successively diagnosed with TB over the next 29 months (fig. 1). The diagnosis was confirmed by chest radiography indicating unilateral (n=3) or bilateral (n=1) forms without cavity, bilateral forms with cavity (n=2), and pleural forms (n=4), as well as by positive smear microscopy (n=6) and/or culture (n=8) (with a pan-susceptible isolate obtained from sputum (n=5), pleural biopsy (n=2) or bronchial lavage (n=1)) or elevated adenosine deaminase levels in pleural fluids (n=2). All patients were immunocompetent, athletic and wealthy, of Caucasian ethnicity and born in Uruguay. No drug abuse, alcoholism, HIV or other comorbidity factor was detected for any of them. They were aged between 17 and 23 years. Nine of the secondary cases were successfully cured by first-line treatment. However, the eighth consecutive secondary case to be diagnosed, more than 2 years after the index case, died of respiratory failure as a result of very advanced TB in an intensive care unit, despite starting treatment immediately.

Standard 24-locus variable-number of tandem-repeat typing [2] demonstrated identical genotypes among the 10 isolates obtained (including an additional, more recent case; see later) and, thus, fully supported the clonality of the outbreak, caused by a strain of branch II of the Latin-American Mediterranean lineage [3, 4] (fig. 1).

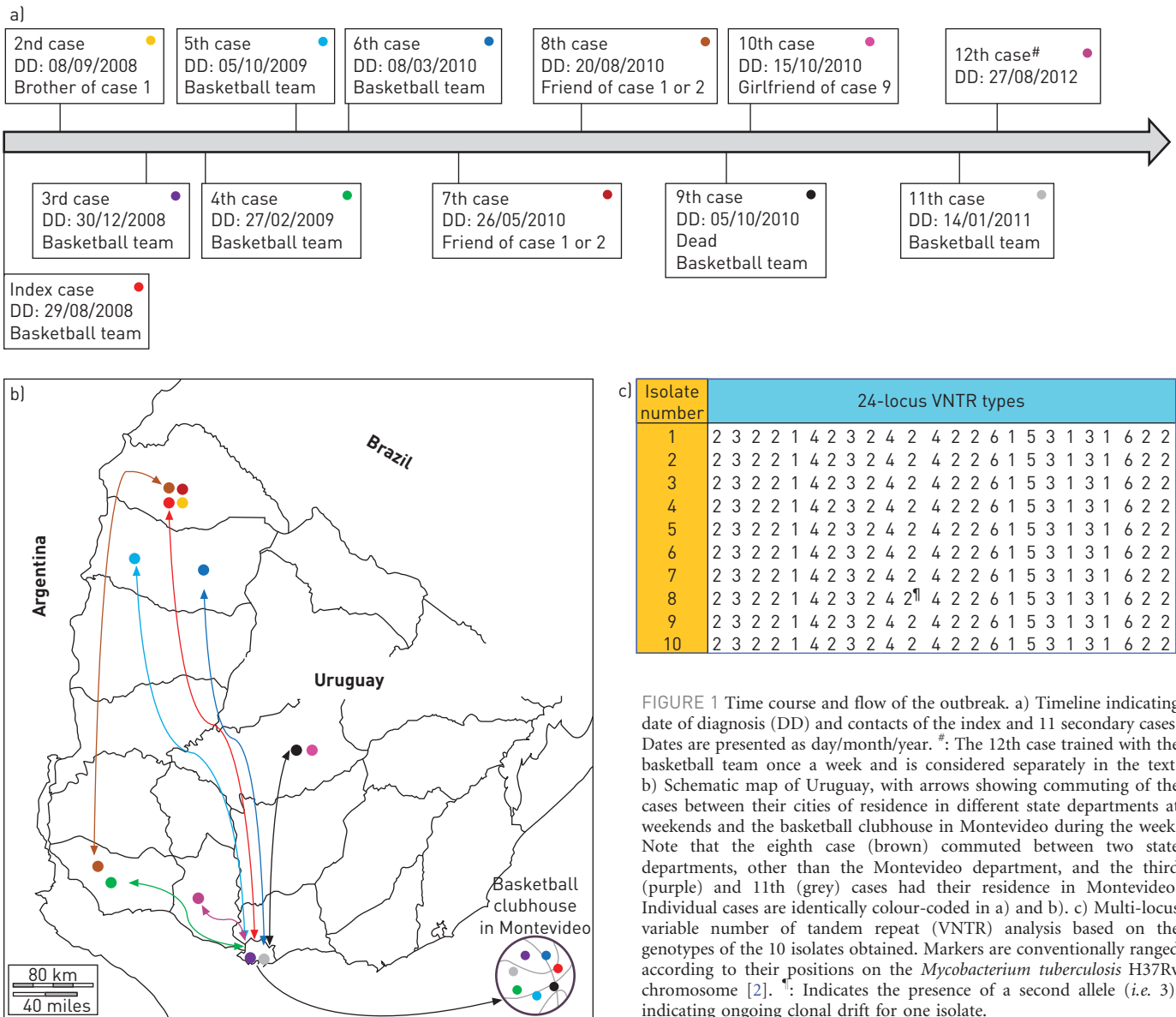


FIGURE 1 Time course and flow of the outbreak. a) Timeline indicating date of diagnosis (DD) and contacts of the index and 11 secondary cases. Dates are presented as day/month/year. #: The 12th case trained with the basketball team once a week and is considered separately in the text. b) Schematic map of Uruguay, with arrows showing commuting of the cases between their cities of residence in different state departments at weekends and the basketball clubhouse in Montevideo during the week. Note that the eighth case (brown) commuted between two state departments, other than the Montevideo department, and the third (purple) and 11th (grey) cases had their residence in Montevideo. Individual cases are identically colour-coded in a) and b). c) Multi-locus variable number of tandem repeat (VNTR) analysis based on the genotypes of the 10 isolates obtained. Markers are conventionally ranged according to their positions on the *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv chromosome [2]. †: Indicates the presence of a second allele (i.e. 3), indicating ongoing clonal drift for one isolate.

Despite control programmes, large clonal TB outbreaks can develop even in low incidence countries, reflecting active ongoing disease transmission [5, 6]. In such settings risks of TB and large, steadily expanding TB case clusters are typically concentrated in socioeconomically underprivileged groups, with well-identified associated risk factors such as alcohol abuse, injectable drug use and homelessness [7].

Our report points to a situation of particularly rapid TB spread in an atypical population category, thought to be at very low risk for TB, without timely implementation of appropriate TB control measures. In the latter category, the rapid spread of TB was probably driven, in part, by an especially acute risk of infection due to reiterated close contacts and strong breathing during intensive daily practice of indoor basketball and to sharing dormitories at the basketball clubhouse during the week. Other factors probably include the increased chance of progression from infection to disease in young, tall, thin adults as pointed out by old reports [8, 9], on the basis of the age and athletic profile of the patients involved and the estimated proportion of infected close contacts who declared the disease within the 2–3-year period after exposure. Indeed, 18 close daily contacts (*i.e.* basketball team members and close friends) deemed to be most at risk were identified for the source case, comprising nine of the 11 secondary TB cases. Out of the nine contacts without a TB diagnosis, four had a positive TB skin test (TST) of ≥ 6 mm induration, suggestive of TB infection, and one with a negative result of 0 mm, while TST results were unavailable for the remaining four. The TB infection rate (TB cases and infected individuals) among the contacts most exposed to the index case was, thus, estimated to be between 72% (13 out of 18) and 94% (17 out of 18), depending on the assumed status of the contacts with missing data. Accordingly, the proportion of infected close contacts who progressed to disease within 2–3 years ranged between 53% (nine out of 17) and 69% (nine out of 13). This elevated disease attack rate sharply contrasts with the lifetime risk of developing active TB, estimated to be <10% among infected individuals in the general population.

Clearly and importantly, as the isolates obtained were all fully sensitive to drugs, all the secondary cases (including the fatal case) were theoretically preventable by timely application of effective contact tracing coupled with chemoprophylaxis. Most patients had their permanent residence in different cities in five different departments/provinces of the country (fig. 1). The index case was diagnosed in the capital, Montevideo, and he then immediately returned to his hometown, where his family live, to receive treatment. His familial contacts were investigated, leading to diagnosis of TB in his brother 1 month later, while the other family contacts received chemoprophylaxis.

Such measures were implemented much more belatedly for the other contacts involved, although the link with the basketball team was identified from the beginning. As these individuals were cohabiting with the index case only from Monday to Friday (*i.e.* at the basketball clubhouse) but spent their weekends with their families, they were defined as working contacts. As per the guidelines of the national TB control programme, the list of these contacts was requested from the employer (*i.e.* the professional basketball club) and not from the index case. However, this list was sent very late and, furthermore, the case was not properly made for obtaining it as quickly as possible. In addition, even after the list was received, some contacts did not respond to investigator calls and/or refused to receive chemoprophylaxis, as has been frequently seen elsewhere [10].

As a predictable consequence of this delayed implementation of control measures, a further, 11th secondary case (fig. 1) was diagnosed in August, 2012 (and has now successfully completed treatment), corresponding to a 17-year-old individual who was training with the team once a week. Strain typing data showed that this case indeed represented an extension of the same outbreak.

It is noteworthy that investigation of 23 other, more distant contacts of the source case did not reveal additional TB cases. This absence of extension beyond the circle of the basketball team (including the source case's brother and two close friends with the same low risk profiles; see earlier) tends to suggest that the outbreak characteristics are related to the specific characteristics of the host group, rather than to an increased virulence of the *M. tuberculosis* strain involved.

Knowing the specific outbreak potential in such a group, with the benefit of hindsight, we wish we had triggered more intensive contact investigation shortly after the first case, and had offered preventive therapy to all infected contacts, such as that recommended by European standards for TB care [11], by informing them about the specially increased risk of progression to active disease in this specific context. Such intensive interventions are necessary to achieve TB elimination, given the low incidence setting of this micro-epidemic [10].



@ERSpublications

Tuberculosis can rapidly spread among individuals thought at low risk, without timely application of control measures <http://ow.ly/qvuDS>

Cecilia Coitinho¹, Gonzalo Greif², Carlos Robello^{2,3}, Paula Laserra¹, Eve Willery⁴ and Philip Supply⁴

¹Comisión Honoraria de Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes, Montevideo, ²Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, and ³Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ⁴INSERM U1019-CNRS UMR 8204, Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille, Univ Lille Nord de France, Lille, France.

Correspondence: P. Supply, INSERM U1019-CNRS UMR 8204, Institut Pasteur de Lille, 1 Rue du Prof Calmette, Lille, 59019, France. E-mail: philip.supply@ibl.fr

Received: Aug 30 2013 | Accepted after revision: Sept 29 2013 | First published online: Oct 10 2013

Conflict of interest: Disclosures can be found alongside the online version of this article at www.erj.ersjournals.com

Acknowledgements: C. Rivas (Comisión Honoraria de Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes, Montevideo, Uruguay) is thanked for support and M. Haddad (Outbreak Investigations Team, Division of Tuberculosis Elimination, CDC, Atlanta, USA) for insightful discussion.

References

- 1 World Health Organization. Tuberculosis country profiles. Uruguay. https://extranet.who.int/sree/Reports?op=Replet&name=%2FWHO_HQ_Reports%2FG2%2FPROD%2FEFT%2FTBCCountryProfile&ISO2=UY&LAN=EN&outtype=html Date last accessed: August 30, 2013.
- 2 Supply P, Allix C, Lesjean S, *et al*. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4498–4510.
- 3 Cardoso Oelemann M, Gomes HM, Willery E, *et al*. The forest behind the tree: phylogenetic exploration of a dominant *Mycobacterium tuberculosis* strain lineage from a high tuberculosis burden country. *PLoS One* 2011; 6: e18256.
- 4 Weniger T, Krawczyk J, Supply P, *et al*. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: W326–W331.
- 5 Allix-Béguec C, Supply P, Wanlin M, *et al*. Standardised PCR-based molecular epidemiology of tuberculosis. *Eur Respir J* 2008; 31: 1077–1084.
- 6 Gardy JL, Johnston JC, Ho Sui SJ, *et al*. Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak. *N Engl J Med* 2011; 364: 730–739.
- 7 Fok A, Numata Y, Schulzer M, *et al*. Risk factors for clustering of tuberculosis cases: a systematic review of population-based molecular epidemiology studies. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008; 12: 480–492.
- 8 Rieder HL, Cauthen GM, Comstock GW, *et al*. Epidemiology of tuberculosis in the United States. *Epidemiol Rev* 1989; 11: 79–98.
- 9 Palmer CE, Jablon S, Edwards PQ. Tuberculosis morbidity of young men in relation to tuberculin sensitivity and body build. *Am Rev Tuberc* 1957; 76: 517–539.
- 10 Diel R, Loddenkemper R, Zellweger JP, *et al*. Old ideas to innovate tuberculosis control: preventive treatment to achieve elimination. *Eur Respir J* 2013; 42: 785–801.
- 11 Migliori GB, Zellweger JP, Abubakar I, *et al*. European union standards for tuberculosis care. *Eur Respir J* 2012; 39: 807–819.

Eur Respir J 2014; 43: 903–906 | DOI: 10.1183/09031936.00150413 | Copyright ©ERS 2014

Severe pulmonary embolism decreases plasma L-arginine

To the Editor:

Measurements from humans and animal models with pulmonary embolism (PE) have demonstrated increases in multiple vasoconstrictive molecules, including prostaglandins, platelet-activating factor and leukotrienes [1]. Nitric oxide (NO), produced tonically by vascular endothelial nitric oxide synthase (eNOS), plays a pivotal role in maintaining a normal pulmonary vascular resistance under these conditions [2]. These facts underlie the construct hypothesis that in different subjects, PE can obstruct the same degree of pulmonary vasculature but manifest widely different pulmonary arterial resistances.

Preliminary evidence from animal models and humans suggests that acute PE is associated with intravascular haemolysis, related to the severity of PE [3–8]. Intravascular haemolysis liberates haemoglobin and diffusible haem, both of which directly bind NO. Ruptured erythrocytes also release large amounts of the enzyme arginase-1, which cleaves the eNOS substrate L-arginine, producing urea and L-ornithine.

We hypothesised that patients with acute PE that causes significant tricuspid regurgitation (TR) will have acutely increased plasma concentrations of arginase-1, decreased L-arginine and increased asymmetric dimethylarginine (ADMA) compared with patients who have mild PE without TR as well as patients without PE.

Complete Genome Sequence of *Mycobacterium tuberculosis* Strain MtURU-001, Isolated from a Rapidly Progressing Outbreak in Uruguay

Gonzalo Greif,^a Gregorio Iraola,^{b,c} Luisa Berná,^a Cecilia Coitinho,^d Carlos M. Rivas,^d Hugo Naya,^{b,e} Carlos Robello^{a,f}

Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay^a; Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay^b; Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay^c; Comisión Honoraria de Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes, Montevideo, Uruguay^d; Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Paysandú, Uruguay^e; Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay^f

Despite efficient control programs, large clonal outbreaks of tuberculosis (TB) may arise in low-risk populations. Recently, an unusual TB outbreak was reported in Uruguay, reaching an elevated disease attack rate (53 to 69%). Here, we report the genome sequence of the *Mycobacterium tuberculosis* strain associated with this rapidly progressing outbreak, named MtURU-001.

Received 14 December 2013 Accepted 20 December 2013 Published 23 January 2014

Citation Greif G, Iraola G, Berná L, Coitinho C, Rivas CM, Naya H, Robello C. 2014. Complete genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* strain MtURU-001, isolated from a rapidly progressing outbreak in Uruguay. *Genome Announc.* 2(1):e01220-13. doi:10.1128/genomeA.01220-13.

Copyright © 2014 Greif et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported license](http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

Address correspondence to Carlos Robello, robello@pasteur.edu.uy.

Recently, we reported an unusual tuberculosis (TB) outbreak centered on a professional basketball team in Montevideo, Uruguay, a country with a low TB incidence (1). In August 2008, a young male member of the basketball team was diagnosed with TB, and a chest X-ray indicated a bilateral pulmonary form with cavities. TB was bacteriologically confirmed 20 days later and the patient was cured after first-line treatment. As described in Coitinho et al. (1), following this index case, six other team members who lived at the same place for a week and four other contacts were successively diagnosed with TB over the next 2.5 years. All patients (ranging between 17 and 23 years of age) were immunocompetent, athletic, and wealthy. No other comorbidity factors were detected.

Despite control programs, large clonal TB outbreaks can develop even in low-incidence countries, reflecting ongoing disease transmission (2, 3). The *Mycobacterium tuberculosis* strain showed an elevated disease attack rate (53 to 69%) that sharply contrasts with the lifetime risk of developing active TB, being estimated at <10% among infected individuals in the general population. We report here the draft genome sequence of the TB isolate from the index case.

Sequencing was performed at the Institut Pasteur de Montevideo on an Illumina Genome Analyzer IIx platform and generated 2,379,897 paired-end reads (2 × 100 cycles). The resulting library was first corrected using ALLPATHS-LG (4) and then assembled with Velvet (5) software, producing 195 contigs with an average coverage of 84-fold. The assembly quality was improved using the PAGIT toolkit (6), based on the genome sequence of *M. tuberculosis* H37Rv (GenBank accession no. NC_000962) as a reference strain. The final assembly quality was evaluated with the Assembly Likelihood Estimator (ALE) software (7), and the assembly was automatically annotated with RAST (8).

M. tuberculosis MtURU-001 has a circular chromosome of 4,378,296 bp, with an average G+C content of 65%, including

4,314 protein-encoding genes, 1 rRNA operon, and 45 tRNA genes. In comparison with *M. tuberculosis* H37Rv, 4,096 orthologous groups were defined with OrthoMCL (9) and 1,016 polymorphisms were identified using the Burrows-Wheeler Aligner (BWA) (10) and GATK (11). A subset of 849 polymorphisms (802 single-nucleotide polymorphisms [SNPs] and 47 indels) were inside coding sequences, and 480 affect protein sequences, especially 24 that introduced stop codons disrupting several hypothetical proteins, one transcriptional regulator, 2 genes for the haloacid dehalogenase (HAD) superfamily, and 3 involved in lipid metabolism. Further comparative genomics across this genome may provide genotype-phenotype associations that might explain the rapid progression of this unusual outbreak.

Nucleotide sequence accession numbers. This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession no. [AZHK00000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AZHK00000000). The version described in this paper is version [AZHK01000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AZHK01000000).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the Comisión Honoraria de Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes (MSP, Uruguay) and the Institut Pasteur de Montevideo and by a fellowship from INNOVA-Uruguay (to L.B.).

REFERENCES

- Coitinho C, Greif G, Robello C, Laserra P, Willery E, Supply P. 10 October 2013. Rapidly progressing tuberculosis outbreak in a very low risk group. *Eur. Respir. J.* <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00150413>.
- Allix-Béguec C, Supply P, Wanlin M, Bifani P, Fauville-Dufaux M. 2008. Standardised PCR-based molecular epidemiology of tuberculosis. *Eur. Respir. J.* 31:1077–1084. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00053307>.
- Gardy JL, Johnston JC, Ho Sui SJ, Cook VJ, Shah L, Brodtkin E, Rempel S, Moore R, Zhao Y, Holt R, Varhol R, Birol I, Lem M, Sharma MK, Elwood K, Jones SJ, Brinkman FS, Brunham RC, Tang P. 2011. Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis out-

- break. *N. Engl. J. Med.* 364:730–739. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1003176>.
4. Butler J, MacCallum I, Kleber M, Shlyakhter IA, Belmonte MK, Lander ES, Nusbaum C, Jaffe DB. 2008. ALLPATHS: *de novo* assembly of whole-genome shotgun microreads. *Genome Res.* 18:810–820.
 5. Zerbino DR, Birney E. 2008. Velvet: algorithms for *de novo* short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 18:821–829. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.074492.107>.
 6. Swain MT, Tsai IJ, Assefa SA, Newbold C, Berriman M, Otto TD. 2012. A post-assembly genome-improvement toolkit (PAGIT) to obtain annotated genomes from contigs. *Nat. Protoc.* 7:1260–1284. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2012.068>.
 7. Clark SC, Egan R, Frazier PI, Wang Z. 2013. ALE: a generic assembly likelihood evaluation framework for assessing the accuracy of genome and metagenome assemblies. *Bioinformatics* 29:435. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bts723>.
 8. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formisano K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9:75. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.
 9. Li L, Stoeckert CJ, Jr, Roos DS. 2003. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res.* 13:2178–2189. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.1224503>.
 10. Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics* 25:1754–1760. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>.
 11. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA. 2010. The genome analysis toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 20:1297–1303. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.107524.110>.

Whole-Genome Sequencing of an Isoniazid-Resistant Clinical Isolate of *Mycobacterium tuberculosis* Strain MtURU-002 from Uruguay

Luisa Berná,^a Gregorio Iraola,^{b,c} Gonzalo Greif,^a Cecilia Coitinho,^d Carlos M. Rivas,^d Hugo Naya,^{b,e} Carlos Robello^{a,f}

Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay^a; Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay^b; Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay^c; Comisión Honoraria de Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes, Montevideo, Uruguay^d; Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Paysandú, Uruguay^e; Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay^f

The incidence of tuberculosis in Uruguay has been effectively reduced to <30 per 100,000 population, although an increase in nonrisk populations in the last few years is evident. Here, we present the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* strain MtURU-002 isolated from a patient showing bilateral pulmonary tuberculosis that was resistant to isoniazid.

Received 17 June 2014 Accepted 26 June 2014 Published 17 July 2014

Citation Berná L, Iraola G, Greif G, Coitinho C, Rivas CM, Naya H, Robello C. 2014. Whole-genome sequencing of an isoniazid-resistant clinical isolate of *Mycobacterium tuberculosis* strain MtURU-002 from Uruguay. *Genome Announc.* 2(4):e00655-14. doi:10.1128/genomeA.00655-14.

Copyright © 2014 Berná et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported license](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

Address correspondence to Carlos Robello, robello@pasteur.edu.uy.

Tuberculosis (TB), caused by infection with *Mycobacterium tuberculosis*, constitutes a major cause of morbidity and mortality worldwide, ranking as the second leading cause of death from a single infectious agent, after human immunodeficiency virus. In Uruguay, the National Tuberculosis Program has effectively reduced the incidence of TB to <30 per 100,000 population, with 600 to 700 new cases per year (data available at the World Health Organization Web page [<http://www.who.int/>]). However, in the last 5 years, there has been an increase in TB incidence not only in high-risk populations (patients with human immunodeficiency virus and TB coinfection, those in poverty, and prisoners) but also in nonrisk populations, such as in our recent report of 11 cases of well-nourished young subjects affected by the disease (1). In this context, the whole-genome study of isolates from different populations (high- and low-risk) becomes a necessity in order to perform future comparative genomic studies and to determine new molecular markers of pathogenicity and transmissibility, among other aims. In this work, we performed the complete genome sequencing of a clinical isolate from a patient showing bilateral pulmonary tuberculosis that was resistant to isoniazid.

Sequencing was performed at the Institut Pasteur de Montevideo on an Illumina platform. A total of 1,496,856 paired-end reads (2 × 100 cycles) were generated; the reads were corrected using AllPaths-LG (2), and then Velvet (3) software was used for the *de novo* assembly. A total of 169 contigs were found, with an average coverage of 69-fold. Using the reference genome of *M. tuberculosis* H37Rv (accession no. NC_000962), the assembly quality was further improved through the PAGIT toolkit (4) and evaluated with the Assembly Likelihood Estimator (ALE) software (5). Finally, automatic annotation was performed using RAST (6). *M. tuberculosis* strain MtURU-002 has a total of 4,324,103 bp, with an average G+C content of 63%. It contains 4,328 predicted coding sequences (CDSs), 1 rRNA operon, and 45 tRNA genes. Single nucleotide polymorphisms versus *M. tuberculosis* H37Rv were identified using BWA (7) and the GATK pipeline (8). A total of 540 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and 35 indels were

found. Of them, 482 belong to coding sequences, and 8 introduce stop codons disrupting membrane protein-related genes involved in lipid metabolism or cell wall processes.

As mentioned, drug sensitivity analysis revealed the isolate to be resistant to isoniazid. Remarkably, we did not identify any reported mutation related to this resistance (<https://tbdreamdb.ki.se>). However, we found a novel mutation, G471S, in the *iniB* gene (isoniazid inducible gene) that might explain resistance. Further studies should be done to evaluate the ability of the *iniB* gene to confer isoniazid resistance.

Nucleotide sequence accession number. This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession no. [JNGE00000000](https://ncbi.nlm.nih.gov/nucl/JNGE00000000).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the Comisión Honoraria de Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes (MSP, Uruguay), Agencia Nacional de Investigación e Innovación (Uruguay) grant DCI-ALA/2011/023-502 “Contrato de apoyo a las políticas de innovación y cohesión territorial,” and FOCM (MERCOSUR Structural Convergence Fund), COF 03/11.

REFERENCES

- Coitinho C, Greif G, Robello C, Laserra P, Willery E, Supply P. 2013. Rapidly progressing tuberculosis outbreak in a very low risk group. *Eur. Respir. J.* 43:903–906. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00150413>.
- Butler J, MacCallum I, Kleber M, Shlyakhter IA, Belmonte MK, Lander ES, Nusbaum C, Jaffe DB. 2008. AllPaths: *de novo* assembly of whole-genome shotgun microreads. *Genome Res.* 18:810–820. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.7337908>.
- Zerbino DR, Birney E. 2008. Velvet: algorithms for *de novo* short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 18:821–829. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.074492.107>.
- Swain MT, Tsai IJ, Assefa SA, Newbold C, Berriman M, Otto TD. 2012. A post-assembly genome-improvement toolkit (PAGIT) to obtain annotated genomes from contigs. *Nat. Protoc.* 7:1260–1284. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2012.068>.
- Clark SC, Egan R, Frazier PI, Wang Z. 2013. ALE: a generic assembly likelihood evaluation framework for assessing the accuracy of genome and metagenome assemblies. *Bioinformatics* 29:435. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bts723>.

6. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9:75. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.
7. Li H, Durbin R. 2010. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 26:589–595. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp698>.
8. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytzky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA. 2010. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 20:1297–1303. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.107524.110>.

Available at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/IJMYCO

Short Communication

Identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex by polymerase chain reaction of Exact Tandem Repeat-D fragment from mycobacterial cultures

C. Coitinho ^{a,*}, G. Greif ^b, C. Robello ^{b,c}, J. van Ingen ^d, C. Rivas ^a

^a Comisión Honoraria para la Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes, Centro de Referencia Nacional para Micobacterias, Departamento de Laboratorio, 18 de Julio av. 2175 6p, CP 11200 Montevideo, Uruguay

^b Institut Pasteur de Montevideo, Mataojo 2020, CP 11400 Montevideo, Uruguay

^c Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Gral. Flores 2125, CP 11800 Montevideo, Uruguay

^d Department of Clinical Microbiology, Radboud University Nijmegen Medical Center, 6500 HC, P.O. Box 9102, Nijmegen, The Netherlands

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 June 2012

Accepted 22 July 2012

Available online 27 August 2012

Keywords:

ETR-D

M. tuberculosis complex

Identification

Diagnosis

ABSTRACT

This study evaluated an in-house polymerase chain reaction (PCR) for rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) using the MTBC-specific Exact Tandem Repeat D (ETR-D) as the amplification target. In a prospective study, 801 clinical isolates identified as MTBC and 15 nontuberculous mycobacteria were analyzed. Mycobacterial DNA was extracted from automated broth cultures or from egg-based media. The amplification of the ETR-D showed to a sensitivity of 99.6% and a specificity of 100% for the correct identification of MTBC; improved extractions protocols led to 100% sensitivity. The main utility of this technique is the simplicity, rapidity, low cost and accuracy.

© 2012 Asian-African Society for Mycobacteriology. All rights reserved.

Introduction

In Uruguay, tuberculosis (TB) is still a health problem. The notified annual incidence is $24 \times 100,000$ inhabitants, and it has remained stable in the last 10 years. The isolation of other opportunistic nontuberculous mycobacteria (NTM) as etiological agents of mycobacteriosis is restricted to the HIV/AIDS population.

To improve the control of tuberculosis, TB control programs must have access to rapid and accurate laboratory diagnosis [1]. New tools to improve the laboratory diagnosis of TB have been developed in the last years [1]. Automated

broth culture (ABC) systems are now able to detect mycobacterial growth within 1–3 weeks while solid media take 3–8 weeks [2]. Moreover, nucleic acid amplification (NAA) assays for identification of mycobacteria improve sensitivity and time-to-diagnosis compared with phenotypic identification. Sequence analysis of the Exact Tandem Repeat-D (ETR-D; synonym MIRU04) was postulated as a rapid method for the identification of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) [3].

The aim of this study was to evaluate the ETR-D region as a PCR target to detect and differentiate members of MTBC from NTM.

* Corresponding author. Tel.: +598 22005888; fax: +598 24031975.

E-mail address: ccoitinho@yahoo.com (C. Coitinho).

2212-5531/\$ - see front matter © 2012 Asian-African Society for Mycobacteriology. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmyco.2012.07.002>

Methods

Study design

The study was carried out with samples obtained from July 2010 to May 2012 by the National TB Reference Center of Uruguay. In total, 816 positive cultures obtained from patients with clinical and radiological suspected TB, or other mycobacterial disease, were included. To determine sensitivity and specificity, a positive culture on Löwenstein–Jensen medium was used as the gold standard for the presence of TB. Phenotypic and genotyping characterization was performed using previously described methods [4,5].

Strains

Two hundred and forty-six strains recovered from ABC isolates (biopsies, exudates, and puncture fluid samples) were evaluated using the MB-BacT TB system (Biomerieux®), and 570 strains recovered from sputum cultured in egg-based media (Löwenstein–Jensen and Ogawa).

Phenotypic and genotypic identification

Phenotypic characterization was performed using previously described methods [4,5], and complementary genotyping identification, if it was needed, was made using the hsp65 PCR-restriction fragment length polymorphism analysis as described by Telenti [6] and Devallois [7]; 801 strains were identified as members of MTBC (797 *M. tuberculosis* and 4 *M. bovis*). The other 15 strains were identified as NTM (*M. avium*: 7; *M. intracellulare* st18: 2; *M. kansasii*: 2; *M. fortuitum*: 2; *M. abscessus*: 2).

Also tested were the reference strains: *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), *M. avium* (ATCC 25291), *M. kansasii* (ATCC 12478), *M. scrofulaceum* (ATCC 19981), *M. bovis* (AN5 Rotterdam) and *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. terrae*, and *M. bovis*-BCG, from the National Reference Culture Collection of Uruguay (NRCCU) as controls. *M. africanum* and other rare members of the complex not encountered in Uruguay were not included in this work.

DNA extraction

Five milliliters of positive ABC fluid or 1 ml suspension from a loop-full of bacterial colonies were centrifuged at 4000g × 30 min; the pellet was re-suspended in 0.5 ml of purified sterile water and heated (95 °C, 30 min); after cooling, the sample was frozen and thawed three times (protocol from [8] with minor modifications).

PCR conditions

The reaction mix contained 1 pmol of previously described primers [3], 1 Unit of Taq DNA polymerase (Fermentas, Germany), 1× reaction buffer and 0.25 mM of dNTPs. The reaction conditions involved an initial step at 95 °C for 3 min, 35 cycles at 95 °C for 30 s, at 60 °C for 20 s and 72 °C for 30 s, with 3 min at 72 °C for the final extension. The amplified products were electrophoresed in 2% agarose and visualized with

ethidium bromide. Parallel partial *rpoB* PCR amplification [9] was used as a control of inhibition. Cross-contamination was not a problem, since all negative controls remained negative throughout the study.

Sequence analysis

ETR-D amplicons were sequenced with BigDyeTerminator chemistry (Applied Biosystems, USA) in ABI3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) and analyzed in SequenceScanner v1.0 (Applied Biosystems, USA).

Results

ETR-D PCR results are shown in Table 1. The sensitivity of the ETR-D assay was 99.6% and specificity was 100%, with a positive predictive value (PPV) of 100% and a negative predictive value (NPV) of 88%.

The three isolates with discrepant results were re-analyzed with a fresh DNA extraction, and these proved ETR-D positive. All the different lengths of ETR-D amplicons were sequenced to confirm the numbers and lengths of repeats (Table 2). Four isolates phenotypically identified as *M. bovis* showed PCR fragment lengths (680 bp) similar to those observed in *M. bovis* reference strains.

Seven strains with a fragment length of 824 bp and two strains with fragment lengths of 528 bp were identified as *M. tuberculosis* (data included in the total 798 strains).

Discussion

ETR-D PCR is a fast and accurate method for preliminary identification of positive mycobacterial cultures, with a sensitivity and specificity of 99.6% and 100%, respectively, and a PPV of 100% and an NPV of 88% (calculations according to [10]). Three of 801 (0.003%) MTBC isolates showed false negative results in the first amplification. Because a negative result indicates NTM infection, it may be recommended to repeat amplification (although *rpoB* control works) to prevent false negative results, especially if isolates resemble *M. tuberculosis* complex bacteria, phenotypically. The assay's performance could be enhanced with the optimization of the DNA extraction process and the use of an internal control of amplification with similar efficiencies as the ETR-D amplicon.

Of the 801 clinical MTBC isolates, 797 (98%) corresponded to *M. tuberculosis*, based on ETR-D fragment length, four isolates identified as *M. bovis* showed a distinct fragment length (680 bp), allowing the researchers to suspect the presence of *M. bovis* as an etiological agent, an added advantage.

Djelouadji et al. [3] reported more heterogeneity in the length of ETR-D. These differences could be explained by limited genotypic diversity of MTBC in Uruguay, where Latin-American Mediterranean, S and T genotypes make up 84% of all isolates [11].

This assay is easy to perform, less expensive than commercially available NAA assays or immunochromatographic tests and permits differentiation between MTBC and NTM within hours. The average turnaround time was 10 days for PCR-ETR-D faster than phenotypic identification.

Table 1 – ETR-D PCR results of 816 strains analyzed.

Phenotypic/genotypic identification	ETR-D positive	ETR-D negative	Total
MTBC ^a	798	3	801
NTM ^b	0	15	15
Total	798	18	816

Sensitivity: 99.6%; Specificity: 100%; PPV: 100%; NPV: 88.3%.

^a MTBC = *M. tuberculosis*: 794; *M. bovis*: 4.

^b NTM = *M. avium*: 7; *M. intracellulare* st18: 2; *M. kansasii*: 2; *M. fortuitum*: 2; *M. abscessus*: 2.

Table 2 – Length distribution of the ETR-D amplicon. The number of repeats was confirmed by sequencing ETR-D representative amplicons.

Length in bp	No. of repeats	Clinical isolates	Percentage
608 ± 6	3; 2x77b, 1x53 bp	788	98.12
824 ± 12	6; 5x77 bp, 1x53 bp	7	0.88
672 ± 6	4; 3x77 bp, 1x53 bp	4	0.75
528 ± 6	2; 1x77 bp, 1x53 bp	2	0.25
Total		801	100.0
Reference Strains			
631	3; 3x77 bp	H37Rv (ATCC 27294)	
555	2; 2x77 bp	<i>M. bovis</i> -BCG (NCCU)	
671	4; 3x77b, 1x53 bp	<i>M. bovis</i> (AN5 Rott.)	

Many in-house assays for identification of MTBC use the IS6110 element as amplification target [12–14]. However, false-positive results have been reported in some NTM, probably related with primers design [11]. Also, false negative results have been described in *M. tuberculosis* strains devoid of IS6110, isolated from East Asian patients [14], so, this technique could be useful for this geographic region.

In conclusion, the ETR-D PCR allows in one step the accurate detection of MTBC discriminating from NTM, and the ability to suspect *M. bovis* as a TB etiological agent.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- [1] D.F. Moore, J.A. Guzman, L.T. Mikhail, Reduction in turnaround time for laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis by routine use of a nucleic acid amplification test, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 52 (3) (2005 Jul) 247–254.
- [2] M.A. Morgan, C.D. Horstmeier, D.R. DeYoung, G.D. Roberts, Comparison of a radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear-negative specimens, *J. Clin. Microbiol.* 18 (2) (1983 Aug) 384–388.
- [3] Z. Djelouadji, D. Raoult, M. Daffe, M. Drancourt, A single-step sequencing method for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex species, *PLoS Neglect. Trop. Dis.* 2 (6) (2008) e253.
- [4] P.T. Kent, G.P. Kubica, *Public Health Mycobacteriology, a Guide for the Level III Laboratory*, US Department of Health and Human Service, Centers for Disease Control, Atlanta, 1985.
- [5] World Health Organization, *Laboratory Services in Tuberculosis control. Culture Part III*, WHO/TB/98.258, Geneva, 1998.
- [6] A. Telenti, F. Marchesi, M. Balz, F. Bally, E.C. Bottger, T. Bodmer, Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis, *J. Clin. Microbiol.* 31 (2) (1993 Feb) 175–178.
- [7] A. Devallois, K.S. Goh, N. Rastogi, Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species, *J. Clin. Microbiol.* 35 (11) (1997 Nov) 2969–2973.
- [8] Y.O. Goguet de la Salmoniere, H.M. Li, G. Torrea, A. Bunschoten, J. van Embden, B. Gicquel, Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Clin. Microbiol.* 35 (9) (1997 Sep) 2210–2214.
- [9] T. Adekambi, P. Colson, M. Drancourt, RpoB-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria, *J. Clin. Microbiol.* 41 (12) (2003 Dec) 5699–5708.
- [10] A. Hassey, D. Gerrett, A. Wilson, A survey of validity and utility of electronic patient records in a general practice, *BMJ* 322 (7299) (2001 Jun 9) 1401–1405.
- [11] G. Greif, C. Coitinho, C. Rivas, J. van Ingen, C. Robello, Molecular analysis of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Uruguay, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 16 (7) (2012) 947–949.
- [12] L.L. Flores, M. Pai, J.M. Colford Jr., L.W. Riley, In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: Meta-analysis and meta-regression, *BMC Microbiol.* 5 (2005) 55.
- [13] W.A. Githui, S.M. Wilson, F.A. Drobniowski, Specificity of IS6110-based DNA fingerprinting and diagnostic techniques for *Mycobacterium tuberculosis* complex, *J. Clin. Microbiol.* 37 (4) (1999 Apr) 1224–1226.
- [14] J. Magdalena, A. Vachee, P. Supply, C. Locht, Identification of a new DNA region specific for members of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *J. Clin. Microbiol.* 36 (4) (1998 Apr) 937–943.

Molecular analysis of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Uruguay

G. Greif,* C. Coitinho,[†] C. Rivas,[†] J. van Ingen,[‡] C. Robello*[§]

*Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, [†]Departamento de Laboratorio, Comisión Honoraria de Lucha Anti-Tuberculosis y Enfermedades Prevalentes, Montevideo, Uruguay; [‡]Department of Clinical Microbiology, Radboud University Nijmegen Medical Center, Nijmegen, The Netherlands; [§]Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay

SUMMARY

The incidence of tuberculosis (TB) is increasing in high-risk populations in Uruguay, possibly owing to emerging resistance. Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) genotyping and *katG* sequence analysis of isoniazid (INH) resistance-associated mutations were performed in 45 INH-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Uruguayan patients. The genotype distribution among INH-resistant isolates shares features of that of neighbouring countries, with a predomi-

nance of Latin American and Mediterranean, T and Haarlem genotypes, although the S genotype was particularly frequent among our isolates. Forty-four per cent of INH-resistant strains harboured the S315T mutation in *katG*; we found novel *katG* mutations (W321X, G269T, P232R and G221Wfs1) that could explain INH resistance.

KEY WORDS: epidemiology; genotyping; drug resistance

IN URUGUAY, the National Tuberculosis Programme (NTP) has effectively reduced the incidence of tuberculosis (TB) to below 30 per 100 000 population, with 600–700 new cases per year.¹ The NTP has been applying the DOTS strategy since 1980, and samples of all the cases in the country are processed at the National Reference Laboratory. In the last 5 years, there has been an increase in TB incidence in high-risk populations (human immunodeficiency virus and TB co-infection, poverty, prisoners); the possibility of the emergence of multidrug resistance in these populations renders typing of circulating drug-resistant strains necessary. As no molecular data on these strains were available in our country, the goal of this work was therefore to contribute to the study of the molecular epidemiology of TB in Uruguay.

Between 2000 and 2005, we investigated the genotype of 45 isoniazid (INH) resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates, which constitute 95% of the circulating resistant strains in Uruguay. INH is a pro-drug that requires activation by the *M. tuberculosis* catalase-peroxidase enzyme *katG*.² We investigated the most frequent *katG* mutations associated with INH resistance in these isolates and in a set of 11 INH-resistant follow-up isolates of patients with previous INH-susceptible isolates.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates

We analysed 34 INH-resistant *M. tuberculosis* isolates from patients who had never received anti-tuberculosis drugs, and 11 strains among previously treated cases (45 total cases), obtained between 2000 and 2005. INH resistance was measured using the proportion method on Löwenstein-Jensen (LJ) medium, testing susceptibility to 0.2 and 1 µg/ml of INH. Isolates were grown on LJ at 37°C.

DNA extraction

A loopful of mycobacterial growth on LJ was suspended in 1 ml of distilled water, heated for 30 min at 90°C, frozen and thawed twice, and centrifuged at 13 500 × g for 10 min.

Genotyping

From the DNA of *M. tuberculosis* isolates, we amplified 15 described mycobacterial interspersed repetitive units-variable number of tandem repeats (MIRU-VNTR) loci using previously published methods.^{3,4} The polymerase chain reaction products were labelled with four different dyes (additional material), and run and analysed in an ABI3130 sequencer/GeneMapper (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

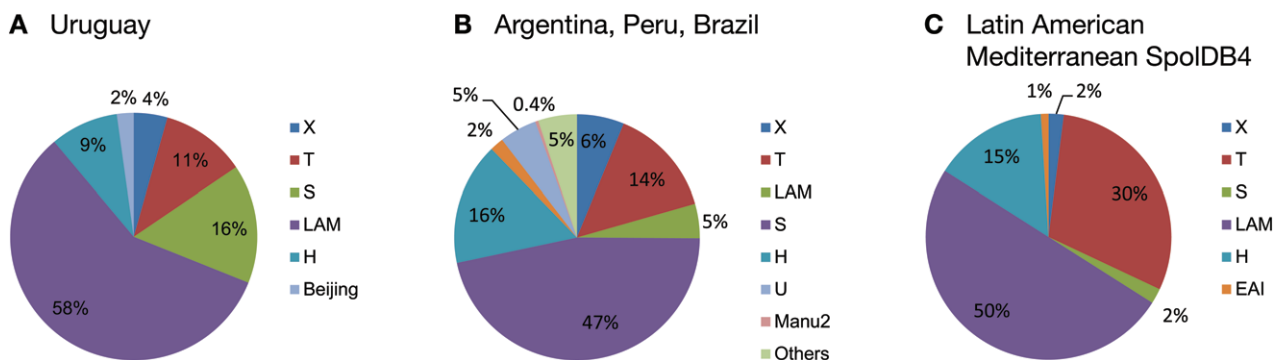


Figure Pie charts of the genotypes observed in 45 INH-resistant isolates and 11 INH-susceptible isolates between 2000 and 2005 in Uruguay (A), and those reported by Dalla Costa et al. (data from Argentina, Peru and Brazil)¹¹ (B), and for Latin American Mediterranean SpolDB4 (C). INH = isoniazid. This image can be viewed online in colour at <http://www.ingentaconnect.com/content/iatld/ijtd/2012/00000016/00000007/art00018>

katG sequencing

We used previously published primers⁵ to amplify a 723 pb fragment. The products were visualised in 2% agarose gel, and 2 µl of the products were sequenced in the Institut Pasteur de Montevideo.

Analysis

MIRU-VNTRplus (<http://www.miru-vntrplus.org/>) was used to determine genotype family and relatedness of isolates.⁶ Alignments were performed using CLUSTAL_X.⁷ The resulting topology and tree were inferred by neighbour joining method and visualised using NJplot.⁸ Protein secondary structure prediction was performed using PSIPRED.⁹

RESULTS

Typing

The distribution of the genotypes found is summarised in the Figure. The Latin American and Mediterranean genotype predominated, with sizeable numbers of T, Haarlem and S genotype family strains.

Isoniazid resistance

Of the 45 resistant isolates, only one came from a multidrug-resistant patient. Twenty (44.4%) were found to be genotypically resistant via *katG* mutations in codon 315 by the occurrence of S315T in 16

(35.5%), S315N in 3 (6%) and S315R in 1 (2.2%). We also found the mutation W328L in one isolate (2.2%) and four mutations not previously reported that could explain INH resistance (W321X, G269T, P232R and G221Wfs1). Two of these resulted in truncated protein; one was a frame shift mutation (G221Wfs1) leading to premature termination resulting in a 221 aminoacid protein, the second was a nonsense mutation at position 321 (W321X). The remaining two were missense mutations; G269T and P232R led to the disruption of the secondary structure, the alpha helix, predicted by PSIPRED.⁹ Using the proportion method, we were able to observe a high resistance level for three of the novel mutations (W321X, G269T and G221Wfs1). The Table summarises the genotyping information and the *katG* mutation profile.

Of the 11 isolates from patients who developed resistance to INH during treatment, we determined one case of exogenous re-infection with a resistant strain without mutations in *katG*, and 10 relapses with the same strain (using MIRU-VNTR, data not shown). We found six newly acquired *katG* gene mutations (1 S315T, 3 S315N, 1 W328L and 1 W321Stop) in these 10 strains; all primary isolates of these 11 patients had wild-type *katG* gene sequences.

No significant associations between specific *katG* mutations and genotype families were observed.

Table INH-resistant strains: genotype and *katG* mutation pattern association*

Genotype	n	<i>katG</i> mutations							No <i>katG</i> mutations
		S315T	S315R	S315N	W321X	G269T	P232R	G221Wfs1	
S	7	4	0	0	1	0	0	0	2
LAM	26	7	1	0	0	1	1	1	15
H	4	3	0	1	0	0	0	0	0
X	2	1	0	1	0	0	0	0	0
T	5	0	0	1	0	0	0	0	4
Beijing	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Total	45	16	1	3	1	1	1	1	21

* New mutations: W321X (S genotype), G269T, P232R and G221Wfs1 (LAM genotype). INH = isoniazid; LAM = Latin American and Mediterranean.

DISCUSSION

We found a genotype distribution similar to that reported among INH-resistant isolates from neighbouring countries.^{10,11} Surprisingly, we recorded more S genotype strains than Dalla Costa et al.¹¹ The S lineage is highly prevalent in Sicily and Sardinia.¹⁰ A sizeable community of Italians immigrated to Uruguay in the first half of the twentieth century, and Uruguayans of Italian descent still make up 9.3% of the population (source: National Institute of Statistics, Montevideo, Uruguay). Italian migration was not as strong in surrounding countries. Its migration history could therefore partially explain the strong presence of the S genotype in Uruguay, as opposed to neighbouring countries.

We did not observe significant differences in S genotype distribution between patients aged <30 years and those aged ≥30 years; this implies that the high S genotype prevalence in Uruguay is not a result of recent introduction. For both the distribution of genotypes and age-relatedness, this study is hampered by the low number of isolates studied and the fact that only INH-resistant isolates were selected. However, data from Dalla Costa et al.,¹¹ also conducted on resistant isolates, did not show significant changes in the S genotype incidence compared to SpolDB4 (Figure).^{10,11}

The *katG* 315 mutations are those that most frequently confer INH resistance in Uruguay. Although the mutations found in *katG* were lower than those reported worldwide, it should be noted that a partial *katG* sequence was analysed.¹¹ We also found four novel *katG* mutations that explain INH resistance. The observation of these mutations confirms the plasticity of mycobacteria, and indicates the relevance of sequencing in these cases.

In summary, we determined the molecular basis of INH resistance and the genotypes of the INH-resistant strains circulating in Uruguay between 2000 and 2005, an important step for the control and management of TB in Uruguay. Although the genotype distribution shares features with neighbouring countries, the main difference is in the S genotype incidence, which appears to be more frequent among INH-resistant *M. tuberculosis* cases in Uruguay.

Acknowledgements

C Robello is a researcher at the Sistema Nacional Investigadores (ANII), Montevideo, Uruguay. This work was supported by the Institut Pasteur de Montevideo and the Comisión Honoraria de Lucha Anti-Tuberculosis y Enfermedades Prevalentes, Montevideo, Uruguay.

References

- Rodríguez-de-Marco J, Sánchez D, Goya M A. El control de la tuberculosis en Uruguay: 25 años de la implantación del Programa Nacional de Control de la Tuberculosis. Montevideo: OPS2007 contract no. HDM/CD/459-07. Washington DC, USA: Pan American Health Organization, 2007. <http://www.bvsops.org.uy/pdf/tuberculosis.pdf> Accessed February 2012. [Spanish]
- Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* 1992; 358: 591–593.
- Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3563–3571.
- Supply P, Allix C, Lesjean S, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4498–4510.
- Leung E T, Ho P L, Yuen K Y, et al. Molecular characterization of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: identification of a novel mutation in *inhA*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1075–1078.
- Allix-Beguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multi-functional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2692–2699.
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 4876–4882.
- Perriere G, Gouy M. WWW-query: an on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie* 1996; 78: 364–369.
- Jones D T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* 1999; 292: 195–202.
- Brudey K, Driscoll J R, Rigouts L, 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.
- Dalla Costa E R, Ribeiro M O, Silva M S, et al. Correlations of mutations in *katG*, *oxyR-ahpC* and *inhA* genes and in vitro susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. *BMC Microbiol* 2009; 9: 39.

R É S U M É

L'incidence de la tuberculose (TB) augmente dans les populations à haut risque d'Uruguay, peut-être en raison de l'émergence d'une résistance. Le génotypage MIRU et l'analyse de la séquence *katG* des mutations associées à la résistance à l'isoniazide (INH) ont été effectués dans 45 isolats de *Mycobacterium tuberculosis* résistants à l'INH chez des patients d'Uruguay. La distribution des génotypes parmi les isolats résistants à

l'INH partage les caractéristiques observées dans les pays voisins, avec une prédominance des génotypes LAM et Haarlem, bien que le génotype S ait été particulièrement fréquent dans nos isolats. On a noté une mutation S315T dans *katG* dans 44% des souches résistantes à l'INH; nous avons observé des mutations *katG* originales (W321X, G269T, P232R et G221 Wfs1) qui pourraient expliquer la résistance à l'INH.

R E S U M E N

El incremento de la incidencia de tuberculosis (TB) en Uruguay en poblaciones de alto riesgo conlleva al aumento de probabilidad de generación de resistencia al tratamiento. Se llevó a cabo el genotipado y análisis de mutaciones en la secuencia del gen *katG* asociadas a resistencia a isoniazida (INH) en 45 aislados de pacientes uruguayos. La distribución de los genotipos entre los aislados resistentes a INH es similar a lo observado en

países vecinos, con predominancia de los genotipos LAM, T y Haarlem, aunque la frecuencia del genotipo S resultó particularmente elevada en nuestros aislados. Cuarenta y cuatro por ciento de las cepas resistentes a INH presentaron la mutación S315T en *katG*; encontrándose cuatro nuevas mutaciones en este gen (W321X, G269T, P232R and G221Wfs1) que podrían explicar la resistencia a INH en estos aislados.
