

# Evaluación de *spoligotyping* a partir de baciloscopías como metodología alterna e independiente de cultivo para la genotipificación de *Mycobacterium tuberculosis*

## Evaluation of spoligotyping-smear sputum as an alternative and culture-independent methodology for *Mycobacterium tuberculosis* genotyping

Nancy Montserrat Alvarez-Corrales<sup>1</sup>, Lelany Pineda-García<sup>1</sup>, Jorge Alberto Carrasco Cáceres<sup>1</sup> y Paula Yessenia Aguilar Molina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional Autónoma de Honduras.

Establecimiento (s) donde se realizó el trabajo: Laboratorio de Investigación de Enfermedades Tropicales, UNAH.

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Fuente de Financiamiento: Dirección de Investigación Científica (DICU/UNAH). Beca básica No 11-2017.

Recibido: 14 de enero de 2020 (segunda versión: 23 de noviembre de 2020) / Aceptado: 27 de noviembre de 2020

### Resumen

**Introducción:** Tuberculosis (TBC) sigue siendo la segunda causa de muerte por una enfermedad infecto-contagiosa después del síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida (SIDA). Actualmente, el escenario de técnicas y metodologías de laboratorio para la identificación y drogo-sensibilidad está cambiando gradualmente. Se han recomendado e introducido ensayos rápidos basados en la amplificación de ácidos nucleicos (NAAT's) que se desarrollan mediante la reacción de polimerasa en cadena (RPC). Bajo este principio, se destaca *spoligotyping* –una herramienta de genotipificación y epidemiología molecular en TBC– estandarizada a partir de aislados bacterianos, que permite el estudio del genoma de *Mycobacterium* mediante la amplificación de 43 secuencias cortas no repetitivas, localizadas en la región de repetición directa (RD1). **Objetivo:** Evaluación de *spoligotyping* a partir de baciloscopías, como una opción independiente de cultivo, para la caracterización de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de muestras de esputo en pacientes del Instituto Nacional Cardiopulmonar de Tegucigalpa, Honduras. **Método:** De 37 pacientes con cultivo (y baciloscopia) positivos para *M. tuberculosis*, se obtuvieron 50 muestras de expectoración. Se realizó estudio microbiológico y molecular en muestras respiratorias conteniendo ADN de micobacterias, a partir de baciloscopías, concentrados y cultivo, para la identificación y análisis genotípico a través de la técnica de *spoligotyping*. **Resultados:** El *spoligotyping* fue positivo en 37/37 de muestras de cultivo positivo (S: 100%), en 36/37 (S: 97,3%) de muestras con baciloscopia positiva y en 6/10 (S: 60%) de muestras de concentrado de esputo. La

### Abstract

**Background:** Tuberculosis (TB) remains as the second cause of death by an infectious disease preceded by the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Currently, laboratory techniques and methodologies of diagnosis and drug susceptibility testing are constantly changing. Therefore, it has been recommended the introduction of rapid assays based on the amplification of nucleic acids test (NAAT's) through a polymerase chain reaction (PCR). Based on this principle, outstands spoligotyping - as a genotype and molecular epidemiology tool in tuberculosis - it is standardized to use isolated bacteria for the study of *Mycobacterium* genome through the amplification of 43 non-repetitive sequences, located at the direct repetitive region 1 (RD1). **Aim:** Evaluation of spoligotyping from acid fast staining smears as an independent option from bacterial isolation to characterize *Mycobacterium tuberculosis* by using sputum samples from TB patients from National Cardiopulmonary Institute in Tegucigalpa, Honduras. **Method:** Of 37 patients with positive culture (and smear microscopy) for *M. tuberculosis*, 50 expectoration samples were obtained. Microbiological and molecular tests were performed in respiratory samples containing mycobacterial DNA from sputum smears, concentrates and solid culture, for identification and genotype analysis by spoligotyping technique. **Results:** Spoligotyping was positive in 37/37 of positive culture samples (S: 100%), in 36/37 (S: 97.3%) of smear-positive samples and in 6/10 (S: 60%) of concentrate samples sputum. The intensity of positive smear microscopy had a direct relationship with the sensitivity of spoligotyping. **Discussion:**

### Correspondencia a:

Nancy Montserrat Alvarez-Corrales

nancy.alvarez@unah.edu.hn; montseac26@yahoo.com

intensidad de la baciloscopia positiva tuvo una relación directa con la sensibilidad de *spoligotyping*. *Discusión:* El fusionar el potencial de una herramienta útil en epidemiología molecular para analizar muestras de ADN proveniente de baciloscopias, visualiza una plataforma diagnóstica y genotípica para países en vías de desarrollo como una alternativa innovadora y altamente sensible en la hibridación de oligonucleótidos específicos a partir material genético en baciloscopias (P+, P++, P+++), pero requiere mejorar la concordancia entre patrones genéticos obtenidos, comparables con el uso estandarizado de aislados de cepas de *M. tuberculosis*.

*Palabras clave:* tuberculosis; *spoligotyping*; baciloscopia; esputo; Honduras.

This study combined the potential of a molecular epidemiology tool to analyse DNA from sputum samples in smears acid fast staining, it visualizes diagnosis and genotyping platform in developing countries gathering innovation and high sensitivity in the hybridization of specific oligonucleotides from positive smears (P+, P++, P+++). However, the low specificity showed the need to improve better agreement among genetic patterns compared to the standardized bacterial isolation from *M. tuberculosis* strains.

*Keywords:* tuberculosis; *spoligotyping*; acid fast staining; smear sputum; Honduras.

## Introducción

Mundialmente, la tuberculosis (TBC) afecta 10,4 millones de personas al año, y mata alrededor de 1,8 millones<sup>1-3</sup>. Uno de los principales retos para el control mundial de la TBC es el diagnóstico oportuno para evitar la transmisión de la enfermedad entre los pacientes.

En Honduras, el diagnóstico primario de la TBC suele recaer sobre la evaluación microscópica y correlación clínica. La evaluación de baciloscopia continúa siendo la técnica de menor costo y es la prueba de discriminación en el laboratorio más utilizada en todo el mundo. Asimismo, el cultivo en medios con base de huevo es ampliamente utilizado y tiene mayor sensibilidad que la microscopía; sin embargo, tiene limitaciones en cuanto al alcance y sostenibilidad del mismo en los laboratorios del país<sup>4,5</sup>.

Para disminuir la incidencia de la TBC en el mundo, en los últimos años se han desarrollado diversas formas diagnósticas, entre ellas la modificación de metodologías básicas de baciloscopia y cultivo, otros ensayos como los serológicos e inmunológicos, enzimáticos y técnicas de identificación y tipificación molecular para *Mycobacterium tuberculosis*<sup>6</sup>. La evolución diagnóstica ha profundizado en la detección de genotipos, patrones de resistencia y linajes que mejoran la comprensión, manejo y control de casos<sup>7-9</sup>.

La carencia o acceso limitado a dichas metodologías conduce a un retraso en el diagnóstico temprano, así como en el tratamiento oportuno de los pacientes. En Honduras, existen obstáculos que incluyen el costo y acceso al diagnóstico, junto al tiempo de crecimiento prolongado de las micobacterias *in vitro*. Así mismo, la capacidad, espacio y equipos instalados en los laboratorios del sistema de salud se encuentran limitados a ciertos hospitales regionales del país<sup>10</sup>.

Desde 1997, Honduras ha contribuido con estudios de investigación mediante el uso de técnicas de epidemiología molecular capaces de detectar y rastrear la transmisión de cepas entre un paciente y otro, tales como RFLP, MIRU-VNTR y *spoligotyping*. Esta última metodología, descrita por Kamerbeek J. y cols., utiliza amplificación de ADN bacteriano mediante la reacción de polimerasa en cadena (RPC), para determinar el polimorfismo del locus cromosómico DR, detectando la presencia o ausencia de 43 secuencias cortas no repetitivas llamadas

oligonucleótidos. Dichas herramientas diagnósticas contribuyen a los esfuerzos de control y prevención de la TBC a nivel nacional, siendo una plataforma para apoyar y fortalecer la vigilancia y epidemiología tradicional<sup>11,12</sup>.

En este estudio, se utilizó la técnica de *spoligotyping* partiendo de una muestra de ADN estandarizada obtenida a partir de lisados provenientes de colonias de cultivo *M. tuberculosis*<sup>13</sup> - como control - para comparar la sensibilidad de la técnica utilizando muestra de ADN estandarizada a partir de lisados provenientes de baciloscopias y concentrado de cultivos, con el fin de simplificar la técnica y acortar la brecha de tiempo para la obtención del material de estudio, y a la vez, ofertar un diagnóstico oportuno. Se comparó y evaluó una técnica de epidemiología molecular, *spoligotyping*- adaptada al uso de muestras de baciloscopias para demostrar por medio de ensayos de laboratorio, su aplicabilidad, reproducibilidad, efectividad y uso en nuestro contexto de país.

## Métodos

### Diseño del estudio

Enfoque cuantitativo con un diseño experimental y de tipo transversal, donde se desarrolla una técnica de epidemiología molecular basada en el principio de RPC<sup>14</sup> para caracterización de cepas de *M. tuberculosis*, establecido para una colección de muestras de esputo colectadas durante cinco meses, desde junio a noviembre del año 2017.

### Unidad de análisis

Muestras de esputo, proveniente de pacientes sintomáticos respiratorios, con expectoración por más de 15 días y sospecha clínica de TBC. Así mismo, se obtuvo información epidemiológica de registros de laboratorio bajo los estándares de anonimato, confidencialidad y aprobación ética institucional. Los pacientes son atendidos primariamente en la consulta externa u hospitalización del Instituto Nacional Cardiopulmonar (INCP) de Tegucigalpa, Honduras, y proveen la muestra de esputo al laboratorio clínico de dicho centro asistencial. El estudio de las baciloscopias realizadas en el laboratorio pueden tener el siguiente objetivo clínico: diagnóstico o control terapéutico al segundo y quinto mes, basados en las normas nacionales.

En resumen, el *procedimiento* se realizó de la siguiente manera:

- Extendido, tinción Ziehl Neelsen, observación y confirmación microscópica de baciloscopías en el Laboratorio de Investigación de Enfermedades Tropicales (LIET-UNAH).
- Cultivo de esputo, revisión y obtención de cepas realizado en el Laboratorio Nacional de Vigilancia de Tuberculosis (LNV-TB), en medios de Lowenstein Jensen, usando el método de Petroff y realizando revisiones semanales hasta su identificación bioquímica.
- Durante el proceso de descontaminación, también se obtuvo concentrado de esputo para realización de lisados y posterior comparación.
- Obtención de ADN de cultivo, baciloscopías y concentrado se realizó por medio de lisis celular a 95 °C durante 25 min.
- Amplificación de ADN por RPC con cebadores específicos DRa (5'-GGTTTTGGGCTGACGAC-3') y DRb (5'-CCGAGAGGGGACGGAAAC-3') de la región DR1 en las diversas muestras.
- Por último, *spoligotyping* se realizó a cada amplicón, exponiéndose a 43 oligonucleótidos de la región DR1, inmovilizados sobre una membrana de nylon para hibridación específica y revelado en film autoradiográfico por medio de quimioluminiscencia<sup>11</sup>.
- Validación y uso de cepas control durante los ensayos y análisis mediante cepas de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv, 14323 y *M.bovis*.

*Análisis cuantitativo y estadístico:* Se realizó sobre las metodologías aplicadas y los tipos de baciloscopías positivas (P+++ , P++ , P+) realizando estimaciones de sensibilidad, así como intervalos de confianza de tipo Clopper Pearson del 95%.

El análisis de datos se realizó en varias etapas que incluye: i) la creación de base de datos en hojas de cálculo Excel; ii) elaboración de tablas, gráficos, figuras para la presentación de resultados; iii) valoración de la técnica de *spoligotyping* frente a concentrados de cultivo y baciloscopía; iv) análisis y comparación de códigos octales y patrones genéticos entre sí. Luego del acoplamiento y reconocimiento entre ADN y sondas de oligonucleótidos en el film auto-radiográfico, continuamos bajo los lineamientos y guías estandarizadas para crear un código que es característico de la cepa y posteriormente compararlo con bases de datos internacionales<sup>15</sup>. Para crear los códigos octales, primero se crea un código binario de 0 y 1, se coloca el número 1 donde existe la presencia de un *spot* y se coloca un 0 donde hay ausencia del mismo; luego es agrupado en tripletes y, por último, estos códigos se transforman en octales asignándoles un nuevo valor de cero a siete como se designa a continuación: 000 = 0, 001 = 1, 010 = 2, 011 = 3, 100 = 4, 101 = 5, 110 = 6, 111 = 7. Para

nuestros fines utilizaremos estos códigos para interpretar la presencia o ausencia de reconocimiento de sondas de oligonucleótidos propias de la región DR1. El fin último de los códigos es hacer uso de los números octales para la diferenciación del complejo *M. tuberculosis*, como crear y comprender dendogramas y figuras capaces de analizar variaciones genéticas de las moléculas de ADN de diferentes especies o poblaciones.

## Resultados

El estudio incluyó un total de 37 pacientes sintomáticos respiratorios atendidos en el INCP, quienes brindaron de forma variable entre 1 y 3 muestras de esputo bajo el esquema nacional de obtención de muestras respiratorias, para el estudio de TBC. La muestra obtenida es no probabilística, resultando en 50 muestras de esputo independientes y positivas por baciloscopía.

La distribución de género entre los participantes corresponde a 68% (n: 25) al género masculino y 32% (n: 12) al género femenino.

Los pacientes tenían como lugar de procedencia cinco departamentos de Honduras, teniendo mayor frecuencia el Departamento de Francisco Morazán (n: 29), luego Colón (n: 4), Cortés (n: 2), Comayagua (n: 1) y Yoro (n: 1).

### Distribución etaria

La frecuencia de pacientes con TBC se muestra mayormente en el rango de 20-39 años (n: 15)- población en edad activamente productiva- seguido del rango de 60-79 años de edad (n: 12) y, en menor escala se encuentran (n: 7) pacientes entre 40-59 años y (n: 3) en un rango de 80-89 años de edad.

### Categorización porcentual de baciloscopías

Fueron clasificadas como casos nuevos de TBC 76% (n: 28), 11% (n: 4) como pacientes antes tratados con fármacos anti tuberculosos, 11% (n: 4) con historia clínica de recaída y en 2% (n: 1) correspondía a baciloscopía de control en la segunda fase de tratamiento antituberculoso.

Las muestras de esputo se caracterizaron por ser de buena calidad, clasificándose como mucopurulenta (72%) y sanguinolenta (10%), a la vez se consideró saliva (18%) como muestra de mala calidad.

### Variabilidad cuantitativa de las baciloscopías

Con el objeto de comparar la sensibilidad de detección de oligonucleótidos en ADN obtenido a partir de láminas con variabilidad cuantitativa de bacilos alcohol ácido resistentes (BAAR) presentes, se efectuó la observación microscópica de láminas (n = 50) y se les clasificó de acuerdo a la normativa nacional como: P+++ (42%, n: 21) más de 10 BAAR/campo/100 campos, P++ (28%, n: 14)

1-10 BAAR/campo/50 campos y P+ (30%, n: 15) 1-99 BAAR/100 campos).

La Tabla 1 resume la variabilidad de resultados obtenidos, así como la sensibilidad de la técnica de *spoligotyping*

**Tabla 1. Detección de oligonucleótidos en la región DR1 - *M. tuberculosis* por medio de la técnica *spoligotyping* utilizando lisados de baciloscopías, concentrados y cultivos positivos**

Patrones de oligonucleótidos presentes (+) y ausentes (-) en <i>spoligotyping</i> usando lisados de diversas muestras		Clasificación de baciloscopía		
		P+++ n = 18	P++ n = 12	P+ n = 7
Cultivo	<i>Spoligotyping</i> (+)	18	12	7
	<i>Spoligotyping</i> (-)	0	0	0
Baciloscopía	<i>Spoligotyping</i> (+)	17	12	7
	<i>Spoligotyping</i> (-)	1	0	0
Concentrado	<i>Spoligotyping</i> (+)	n = 9	n = 0	n = 1
	<i>Spoligotyping</i> (-)	5	0	1
		4	0	0

**Tabla 2. Sensibilidad de *spoligotyping* en el reconocimiento de oligonucleótidos según la metodología aplicada para la obtención de ADN**

Reconocimiento de oligonucleótidos en <i>spoligotyping</i>	Cultivo	Baciloscopía	Concentrado
Oligonucleótidos presentes	37	36	6
Oligonucleótidos ausentes	0	1	4
Total	37	37	10
Sensibilidad	100%	97.3%	60%
Intervalo de confianza 95%	90,51-100	85,84-99,93	26,24-87,84

**Tabla 3. Sensibilidad estimada según clasificación y variabilidad bacteriana en baciloscopía en comparación con el método de obtención de ADN para el uso de *spoligotyping***

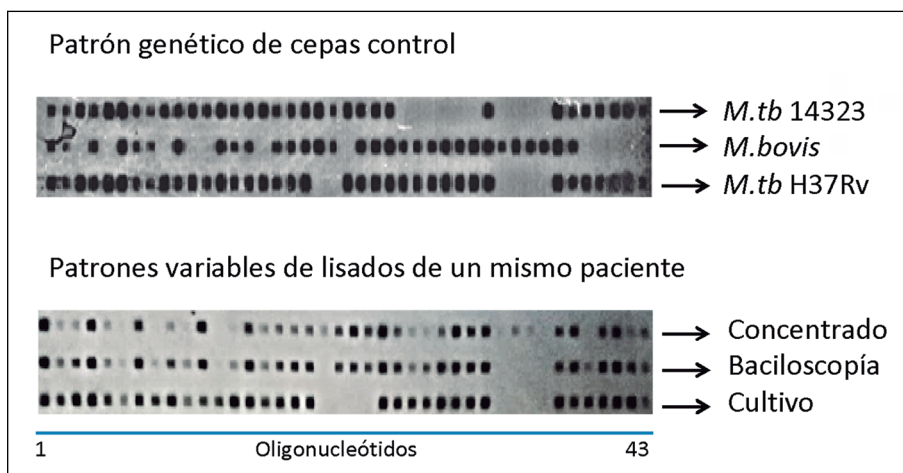
Método de obtención de lisado	Tipo de positividad de baciloscopía	Sensibilidad estimada (%)	IC 95%
Cultivo	P+++	100	81.47-100
	P++	100	73.54-100
	P+	100	59.04-100
Baciloscopía	P+++	94	72.71-99.86
	P++	100	73.54-100
	P+	100	59.04-100
Concentrado	P+++	55	21.20-86.30
	P++	-	-
	P+	100	2.50-100

donde los 43 oligonucleótidos acoplados en una membrana son capaces de reconocer material genético obtenido a partir de lisados de cultivo *M. tuberculosis* positivo, lisado de concentrado y de baciloscopías, independientemente de la positividad, mostrando reconocimiento o señal (*spots*). Sin embargo, esa hibridación entre sondas de oligonucleótidos es inespecífica a lo largo de las 43 secuencias de repetición propias de la región DR1 de *M. tuberculosis* presentando un reconocimiento variado y no reproducible, a pesar de ser material genético de la misma muestra obtenido en distintos momentos del procesamiento. La alta sensibilidad y reproducibilidad de la metodología molecular se obtiene a partir del uso de cebadores específicos y cultivos puros; no obstante, se observa que en lisados de baciloscopías y concentrados el patrón de reconocimiento es inespecífico (Figura 1, Tabla 4).

Determinamos la sensibilidad de *spoligotyping* en el reconocimiento de oligonucleótidos a partir de lisados de cultivo, baciloscopía y concentrado, mediante parámetros de validación de una técnica, comparando los valores verdaderos positivos y falsos negativos mostrados en la Tabla 2, donde se calcula *sensibilidad estimada* de tipo Clopper Pearson y sus respectivos intervalos de confianza de 95% aplicado a las metodologías empleadas. Resultando en sensibilidad para *cultivo*: 100%, *baciloscopía*: 97,3% y *concentrado*: 60%.

Considerando la carga bacilar en la expectoración del paciente, asociado a la baja reproducibilidad de una baciloscopía, analizamos el impacto y positividad de baciloscopía en la capacidad de detección de *spoligotyping*. La Tabla 3, detalla las estimaciones de la sensibilidad aplicada al tipo de metodología y según positividad de baciloscopía, considerando la variabilidad asociada al tamaño de la muestra e intervalos de confianza de 95%. Se observa un valor de sensibilidad real y elevado de 94% con un IC de 72,7-99,8% cuando corresponde al uso de material genético extraído de una baciloscopía P+++ . Igualmente, se observa sensibilidad elevada en baciloscopías P++ y P+ pero con un intervalo de confianza intermedio-alto. En contraste, la sensibilidad a partir de ADN obtenido en el concentrado se ve afectado por el bajo número de muestras analizadas y la alta discordancia de patrones genéticos entre sí, resultando una sensibilidad estimada de 55% con un IC de 21,2-86,3%.

Al desarrollar los ensayos de *spoligotyping*, éstos se validaron con cepas de referencia (Figura 1) visualizando la señal complementaria entre los patrones genéticos de oligonucleótidos específicos de la región DR1 de *M. tuberculosis*. En la parte inferior de la Figura 1, se revela la diversidad de patrones de un mismo paciente respecto al ADN contenido en las modalidades de baciloscopía, concentrado y cultivo; dicha co-variabilidad de patrones



**Figura 1.** Validación de ensayos de *spoligotyping* mediante la identificación y clasificación de patrones genéticos de cepas de referencia.

**Tabla 4.** Lectura binaria y códigos octales obtenidos en el auto-radiograma de *spoligotyping* a partir de ADN de cultivo y baciloscopia de *Mycobacterium tuberculosis* correspondiente a 37 pacientes de este cohorte

#	Cultivo	Baciloscopia	#	Cultivo	Baciloscopia
1	776177607760771	775757777777771	20	777777037720771	555247637742261
2	777777607760771	775357777766671	21	700037607760771	777777777766771
3	677777607760771	No se observa spots	22	777774000060771	777777777766771
4	777775000060771	77777777776771	23	777743777760771	555347777766771
5	77777601560731	77575777776771	24	776077777760771	777777777767771
6	376177607760771	575357677766771	25	777777037720771	555347777766261
7	376177607760771	777757777766771	26	700036777560771	777776777760771
8	376177607760771	77777777776771	27	777777037700071	777777777766771
9	777777347760471	777777677760771	28	777777037700071	777757777766771
10	376177607760771	775777777767771	29	777777037720771	777777777764771
11	777737777760731	775757777760771	30	777776777760771	777756777766771
12	776177607760771	775657777777771	31	757777630760771	777777777777771
13	740701607760771	777757677760771	32	777777037700071	777777777766771
14	637760000020771	777777777777771	33	740777607760771	755357777767771
15	777777037720771	575757777767771	34	376177607760771	555347637746671
16	376177607760771	777757777767771	35	776177607760771	557347637740261
17	636377607760771	577357777766771	36	777777607760771	777777777767771
18	777777606760771	777777677760771	37	376177607760771	777777777767771
19	777777037720771	777347777767661			

genéticos entre sí se observó a repetición entre pacientes, reflejando baja reproducibilidad e inespecificidad en el reconocimiento de sondas.

Así mismo, la Tabla 4, señala la comparación e interpretación de los auto-radiogramas y lectura individual de cultivo vs baciloscopia respectiva, a través de dígitos

binarios, permitiéndonos la obtención de códigos octales en cada ensayo de *spoligotyping*. Es de notar que los códigos obtenidos pertenecen al mismo paciente; sin embargo, no son semejantes entre sí, limitando así el uso de la baciloscopia y fortaleciendo el uso de aislados puros y descontaminados de *M. tuberculosis*.

## Discusión

La TBC es una realidad en el sistema de salud pública local, regional y global. Esta enfermedad requiere constante monitoreo, prevención y vigilancia epidemiológica que se logrará mediante la suma de esfuerzos que incluyen la detección temprana y tratamiento oportuno de los pacientes.

Una prioridad remarcable es el impacto de nuevas soluciones diagnósticas que sean económicas, prácticas y fáciles de usar e implementar en beneficio de individuos, así como en el sistema de salud pública del país cuya probabilidad de éxito está acompañado de capacidades técnicas y monetarias.

En Honduras, al igual que varios países en vías de desarrollo, la baciloscopia sigue siendo la mejor alternativa diagnóstica, siendo un método de bajo costo, fácil, rápido, pero con baja especificidad y sensibilidad<sup>16</sup>. En nuestras condiciones de país, especialmente a nivel estatal, las técnicas de tipificación molecular no son rutinarias, limitadas a ciertos grupos de riesgo poblacional y/o laboratorios con capacidad instalada. Particularmente, el *spoligotyping* ha sido utilizado como investigación, para detectar y monitorear la distribución de cepas circulantes del complejo de *M. tuberculosis*, complementando la epidemiología convencional y permitiendo el estudio de la transmisibilidad entre pacientes (Rosales, 2010, Pineda-García, 1997).

Las técnicas moleculares tienen la ventaja de ser altamente sensibles y específicas en muestras con baciloscopías positivas y con un número bajo de copias de ácidos nucleicos de la secuencia blanco; no obstante, se ve afectada en muestras con baciloscopías negativas y formas extra pulmonares además de la posibilidad de contaminación cruzada en la extracción de ácidos nucleicos.

Diversos autores han desarrollado ensayos moleculares partiendo del uso de láminas de tinciones y baciloscopia de muestras respiratorias y extra-pulmonares, aplicables a la identificación, genotipificación y droga-resistencia de *M. tuberculosis* y otros, aplicables al estudio de lepra y microsporidiosis bajo el mismo principio, reportando ventajas y desventajas sobre la microscopia convencional y obteniendo mejores resultados a partir de una RPC anidada para la amplificación de la secuencia blanco. El éxito de la técnica recae sobre el método de extracción, cantidad, calidad e integridad de ADN extraído<sup>19</sup>.

En 1998, van den Zander y cols., detectaron ADN del complejo *M. tuberculosis* en 23 muestras clínicas de tejido en parafina, diferenciando e identificando 20 de ellas. Así mismo, detectaron y genotipificaron por medio de la hibridación de 43 oligonucleótidos el complejo de *M. tuberculosis* en 8 de 10 baciloscopías, obteniendo patrones genéticos idénticos a aquellos obtenidos en ADN de cultivo<sup>20</sup>. Otros autores han observado en

estudios similares efectuados en Belem, estado de Para, Brasil, que la genotipificación para *M. tuberculosis* por *spoligotyping* a partir de láminas de Ziehl Neelsen suele ser discrepantes en pequeña proporción entre baciloscopías y cultivo<sup>18</sup>.

El *spoligotyping* tiene la ventaja de detectar 20-50 nanogramos de ADN en una cepa bacteriana, mediante el uso de cebadores específicos, lo que permitiría utilizar otras muestras que tienen una cantidad más reducida de BAAR, simplificando la detección de *M. tuberculosis*; sin embargo, el desarrollo de ensayos y comparación de patrones de cultivo vs baciloscopia - en algunos casos- no presenta igualdad entre los resultados. El uso de cepas de referencia (*14323*, *H37Rv*, *M. bovis*) como controles de validación muestra sus códigos binarios y patrones de "spots" con completa certeza y calidad de los resultados.

Es notable considerar que el ADN obtenido en baciloscopías y concentrados no es completamente puro, ya que proviene de una muestra altamente contaminada y acompañada de microbiota del tracto respiratorio superior; esto se convierte en una variante importante para la especificidad y sensibilidad de la técnica<sup>17</sup>. Adicionalmente, las muestras fueron sometidas durante el procesamiento, a la exposición de alcohol ácido, durante la tinción de Ziehl Neelsen, o una base de NaOH 4% durante el proceso de descontaminación, los que podrían alterar o dañar la integridad celular o del ADN si no se mantiene la neutralidad del pH, afectando el reconocimiento y revelado específico de las sondas de oligonucleótidos; esto podría interferir en crear y reproducir con certeza el patrón genético de la cepa causal de la enfermedad a partir de lisados de baciloscopia o concentrado.

El análisis de resultados de sensibilidad y concordancia entre cultivo y baciloscopia nos lleva a profundizar en una fase subsiguiente para relacionar la distribución de variantes genéticas obtenidas a partir de cepas y/o aislados bacterianos obtenidos en esta cohorte. Asimismo, se considera que la variabilidad de perfiles *spoligotyping* discordantes, mostrados en este estudio debe analizarse en detalle explorando infecciones mixtas, reactivaciones o re-infecciones que mediante técnicas más discriminatorias como MIRU-VNTR o RFLP-IS6110<sup>7</sup>, cuyos principios de secuenciación de unidades repetitivas y patrones de RFLP basados en IS 6110 proporcionan mayor especificidad para discriminar entre aislados.

Las limitantes de este estudio radican en el número de muestras analizadas pudiéndose robustecer aún más las sensibilidades estimadas y los coeficientes de confianza establecidos. La alta sensibilidad de la técnica de *spoligotyping* puede variar y decrecer si se emplea ADN de lisados de concentrados. Asimismo, debe considerarse la reproducibilidad *per se* de la baciloscopia, variaciones en la carga bacilar en las expectoraciones del paciente, así como la observación microscópica entre operadores.

La conservación y condiciones de almacenamiento de las láminas deben ser idóneas para el aseguramiento e integridad de la riqueza génica para la identificación y tipificación del complejo *M. tuberculosis*.

Este estudio potencia la aplicabilidad de baciloscopías positivas (P+, P++, P+++) como diana para la obtención de material genético con alta sensibilidad en la hibridación de sondas de oligonucleótidos específicos de la región DR1. Sin embargo, aunque la técnica de *spoligotyping* es muy sensible, no se evidencia una fuerte concordancia entre los patrones genéticos obtenidos a partir de cultivo, que es la muestra por elección y estándar de oro para desarrollar la técnica.

La caracterización y genotipificación de *M. tuberculosis* a través de técnicas diagnósticas moleculares fusionadas con técnicas convencionales, nos permitirán acortar la brecha en la obtención de ADN bacteriano, mayores alcances en el control de TBC de forma más rápida y pertinente, para rastrear la transmisibilidad entre pacientes, identificación de cepas circulantes, fortalecimiento

del diagnóstico y vigilancia en la comunidad, grupos de riesgo y brotes. Siendo trascendental la necesidad de crear políticas nacionales y estrechas colaboraciones que permitan impulsar estas metodologías en beneficio de los pacientes en cada unidad de salud del país.

*Agradecimientos.* A la Dirección de Investigación Científica (DICU) de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras por el financiamiento económico para este estudio. Asimismo, a nuestros colaboradores en las instituciones estatales: Laboratorio Nacional de Referencia y Vigilancia de Tuberculosis, Laboratorio del Instituto Nacional Cardiopulmonar, Laboratorio de Inmunología, Laboratorio de Investigación de Enfermedades Tropicales y los colaboradores en Suecia, Sida/SAREC por ser parte de la capacidad instalada y base fundamental para la implementación y desarrollo de los ensayos. Agradecidos con MSc. Javier Aguilar y su aporte estadístico, y especial gratitud a los pacientes del Instituto Nacional Cardiopulmonar que son parte esencial y motivación para seguir trabajando junto a ellos.

## Referencias bibliográficas

- World Health Organization. Global tuberculosis report 2018: Executive summary [CC BY-NC-SA 3.0 IGO licence] [citado el 13 de enero de 2020]. Disponible en: URL: [https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/tb18\\_ExecSum\\_web\\_4Oct18.pdf](https://www.who.int/tb/publications/global_report/tb18_ExecSum_web_4Oct18.pdf).
- OMS. Tuberculosis Nuevas políticas y actividades de renovación tecnológica en los sistemas de cultivos líquidos: World Health Organization [citado el 13 de enero de 2020]. Disponible en: URL: <https://www.who.int/tb/research/retooling/es/>.
- Pestana L M S. Informe mundial sobre la tuberculosis 2016: Synopsis [gtbr2016\_executive\_summary\_es]. OMS [citado el 13 de enero de 2020]. Disponible en: URL: [https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/gtbr2016\\_executive\\_summary\\_es.pdf](https://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2016_executive_summary_es.pdf).
- Organización Panamericana de la Salud. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte I: Normas y Guía Técnica. Parte I Baciloscopía. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud 2008. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/782>.
- Organización Panamericana de la Salud. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte II Cultivo: Normas y Guía Técnica. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud 2008. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/18616>.
- Pai M, Nicol M P, Boehme C C. Tuberculosis diagnostics: state of the art and future directions. *Microbiol Spectr*. 2016; 4 (5). doi: 10.1128/microbiolspec.TBTB2-0019-2016.
- CDC. TB genotyping 2018 [citado el 13 de enero de 2020]. Disponible en: URL: <https://www.cdc.gov/tb/publications/factsheets/statistics/genotyping.pdf>.
- Ei P W, Aung W W, Lee J S, Choi G E, Chang C L. Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis*: a review of frequently used methods. *J Korean Med Sci*. 2016; 31 (11): 1673-83. doi: 10.3346/jkms.2016.31.11.1673.
- Kato-Maeda M, Metcalfe J Z, Flores L. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*: application in epidemiologic studies. *Future Microbiol*. 2011; 6 (2): 203-16. doi: 10.2217/fmb.10.165.
- OMS. Fortalecimiento de los servicios de laboratorio y de diagnóstico de la tuberculosis: World Health Organization; <https://www.facebook.com/WHO> [citado el 13 de enero de 2020]. Disponible en: URL: <https://www.who.int/tb/laboratory/es/>.
- Rosales S, Pineda-García L, Ghebremichael S, Rastogi N, Hoffner S E. Molecular diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with tuberculosis in Honduras. *BMC Microbiol*. 2010; 10: 208. doi: 10.1186/1471-2180-10-208.
- Pineda-García L, Ferrera A, Hoffner S E. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains from patients with pulmonary tuberculosis in Honduras. *J Clin Microbiol*. 1997; 35 (9): 2393-7. PMID:9276422.
- van Embden J D, Cave M D, Crawford J T, Dale J W, Eisenach K D, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31 (2): 406-9. PMID:8381814.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; 35 (4): 907-14. PMID:9157152.
- Dale J W, Brittain D, Cataldi A A, Cousins D, Crawford J T, Driscoll J, et al. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardised nomenclature. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5 (3): 216-9. PMID:11326819.
- Gordin F, Slutkin G. The validity of acid-fast smears in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114 (10): 1025-7. PMID: 1699506.
- Cohen T, van Helden P D, Wilson D, Colijn C, McLaughlin M M, Abubakar I et al. Mixed-strain *Mycobacterium tuberculosis* infections and the implications for tuberculosis treatment and control. *Clin Microbiol Rev*. 2012; 25 (4): 708-19. PMID:1699506.
- Furlaneto I P, Conceição E C, Brito M L de, Costa A R F d, Monteiro J J B, Gonçalves N V, et al. Genotipagem por spoligotyping de *Mycobacterium tuberculosis* obtidos de lâminas de Ziehl-Neelsen em Belém, Estado

- do Pará, Brasil. Rev Pan-Amaz Saude. 2013; 4 (1): 33-41. <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232013000100005>.
- 19.- Rakotosamimanana N, Sylvianne Rabodoarivelo M S, Palomino J C Palomino, Martin A, Razanamparany V R. Exploring tuberculosis by molecular tests on DNA isolated from smear microscopy slides Int J Infect Dis. 2017; 248-52. doi: 10.1016/j.ijid.2016.12.005.
- 20.- van der Zanden A G, Hoentjen A H, Heilmann F G, Weltevreden E F, Schouls L M, van Embden J D. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in stained microscopic preparations. Mol Pathol 1998; 51 (4): 209-14. doi: 10.1136/mp.51.4.209.