

## Sumario

Vigilancia molecular de la tuberculosis multirresistente en Europa. Proyecto MR-TB . . . . .	95
Estado de las Enfermedades de Declaración Obligatoria . . . . .	101
Resultados de la declaración al Sistema de Información Microbiológica . . . . .	105

## Vigilancia molecular de la tuberculosis multirresistente en Europa. Proyecto MR-TB

E. Rodríguez<sup>1, 2</sup>, M.J. Iglesias<sup>3, 5</sup>, P. Gavín<sup>3, 5</sup>, M.S. Jiménez<sup>4, 5</sup>, S. Samper<sup>3, 5</sup>, O. Tello<sup>1, 2</sup>.

<sup>1</sup> Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III.

<sup>2</sup> CIBER Epidemiología y Salud Pública.

<sup>3</sup> Grupo de Genética de Micobacterias. Universidad de Zaragoza. I+CS, CIBER Enfermedades Respiratorias

<sup>4</sup> Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.

<sup>5</sup> Grupo español de trabajo de tuberculosis multirresistente\*

### Introducción

La resistencia antimicrobiana en microorganismos previamente susceptibles se produce cuando se emplean antibióticos para el tratamiento de las enfermedades infecciosas en humanos y animales. Con el uso —y con el uso incorrecto— creciente de los antibióticos en décadas pasadas, han emergido resistencias en todas las clases de microorganismos, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*. Las cepas salvajes de *M. tuberculosis* que no han sido expuestas a los fármacos antituberculosos casi nunca son resistentes, aunque se ha documentado resistencia natural de *M. bovis* a la pirazinamida. Durante la multiplicación bacteriana, la resistencia a los fármacos antituberculosos se desarrolla espontáneamente y con una frecuencia definida. Se estima que en un ambiente libre de fármacos, la prevalencia de *M. tuberculosis* resistente a la rifampicina (RMP) es de 1 por  $10^8$  bacilos, y de 1 por  $10^6$  para la isoniazida (INH). La utilización de fármacos antituberculosos supone una presión selectiva a favor de los microorganismos resistentes, que se vuelven predominantes, especialmente en pacientes con una gran carga bacilar.

Es extremadamente difícil que se produzca resistencia a múltiples fármacos debido a mutaciones espontáneas. Sin embargo, en una población bacteriana que ya tiene resistencia a INH, una mutación espontánea puede dar lugar a que se produzca resistencia a RMP en algún bacilo. En estas situaciones, el tratamiento de la enfermedad con estos dos fármacos seleccionará las

cepas resistentes a ambos (*multirresistencia*). Una secuencia de sucesos semejante puede producir resistencia a otras combinaciones de fármacos y, eventualmente, a todos los antituberculosos de primera línea.

La emergencia de cepas multirresistentes (MR) se asocia a una variedad de factores relacionados con fallos de los programas de control (falta de regímenes estandarizados, problemas en el suministro de fármacos), en la asistencia médica (prescripción de tratamientos inapropiados, falta de seguimiento de los pacientes), y con factores individuales (poca adherencia al tratamiento, infección por VIH,...).

La descripción de nuevas cepas extremadamente resistentes (XR) y, haber comprobado que determinadas cepas TB-MR se transmiten de forma epidémica, ha levantado de nuevo las alertas de los organismos internacionales. Por la dificultad de su tratamiento TB-MR y XR son las formas más graves de tuberculosis. Su estudio y control están considerados de enorme importancia desde el punto de vista epidemiológico y de salud pública.

### Situación actual de la vigilancia de la tuberculosis resistente en Europa

La vigilancia de la resistencia a fármacos antituberculosos forma parte de las actividades continuas de la vigilancia europea de la tuberculosis, desde el año 1998, a través de EuroTB (Red Europea para la Vigilan-

\* Grupo formado por laboratorios de los hospitales del Sistema Nacional de Salud de todas las Comunidades Autónomas y de las Ciudades Autónomas de Ceuta y Melilla. La lista completa de participantes se encuentra en: <http://genmico.unizar.es>.

cia de la Tuberculosis). Para todos los casos de tuberculosis notificados que han resultado positivos al cultivo se recoge información sobre los resultados de las pruebas de susceptibilidad microbiana frente a la isoniazida, rifampicina, etambutol y estreptomina.

Las limitaciones de este sistema de vigilancia incluyen que la vigilancia de las resistencias se limite a la resistencia al inicio de la enfermedad, pero no a la resistencia desarrollada tras el inicio del tratamiento, o en casos que no se notifican de forma rutinaria, como los casos crónicos. En consecuencia, el número total de casos multirresistentes en la población es mayor que el obtenido por el sistema.

El último informe, correspondiente a 2005<sup>1</sup>, señala que el nivel de resistencia a los fármacos era muy superior en los Estados Bálticos frente al resto de países de Europa que disponen de datos representativos. Señala que la multirresistencia combinada era del 18% en los Estados Bálticos vs el 2% de otros países de Europa occidental. La multirresistencia se asocia con historia de tratamiento previo antituberculoso y origen extranjero. Resultado de la ampliación de la Unión Europea hacia el Este, se espera un aumento en el número de casos de tuberculosis resistentes y multirresistentes, resultando en un aumento potencial del riesgo de transmisión de la TB-MR dentro de sus fronteras.

La vigilancia exhaustiva de la TB-MR fue contemplada tanto en las Recomendaciones OMS-IUATLD sobre vigilancia de resistencias en Europa<sup>2</sup>, como en las del «Grupo europeo para el control y eliminación de la tuberculosis en países de baja incidencia»<sup>3</sup>.

## Vigilancia molecular de la tuberculosis multirresistente

Desde el año 1993, España viene participando en sucesivas Acciones Concertadas cuyo objetivo inicial era utilizar marcadores genéticos estandarizados y crear una red de laboratorios para el control de la tuberculosis. Disponer de los datos epidemiológicos de los casos de TB-MR, apareados con datos de tipificación genética de las cepas, permitiría describir y monitorizar la circulación de estas cepas en la población, e identificar agrupaciones o «clusters» moleculares que podrían representar transmisión reciente así como dirigir investigaciones posteriores para controlar la transmisión de esta forma grave de la enfermedad tuberculosa.

Durante el periodo 2001-2003, dentro de la Acción Concertada «Marcadores Genéticos de nueva generación y Técnicas para la Epidemiología y Control de la Tuberculosis», proyecto financiado por la Comisión Europea ([www.caontb.rivm.nl](http://www.caontb.rivm.nl)), EuroTB participó en el estudio europeo de epidemiología molecular de TB-MR, en colaboración con el Instituto Nacional de Salud Pública y Medio Ambiente (RIVM) de Holanda. En este estudio, los Laboratorios de Referencia de nueve países europeos, entre ellos España, proporcionaron información epidemiológica de los casos de TB-MR y los resultados de la tipificación por RFLP-IS6110 de las cepas correspondientes de *M. tuberculosis*, con el objetivo de describir las características de la población de casos de TB-MR y las agrupaciones moleculares de éstos en Europa. De un total de 683 casos de TB-MR con un aislamiento entre 1998 y 2001, 147 (22%) pertenecían a clusters nacionales y 144 (21%) a clusters europeos. Los clusters europeos variaban en tamaño de 2 a 28 casos

e implicaban a dos o tres países. La pertenencia a clusters estaba asociada a edades jóvenes, coinfección con VIH, y al genotipo Beijing de *M. tuberculosis*. El número de clusters europeos, así como las características de los pacientes incluidos en algunos de ellos sugerían una posible circulación de cepas a través de las fronteras en Europa. Sin embargo, el estudio no estaba diseñado para la investigación posterior de estos vínculos<sup>4</sup>.

## Proyecto MR-TB

Basándose en los resultados de esta Acción Concertada, y teniendo en cuenta el incremento en el número de casos esperados de tuberculosis multirresistente en la UE, la Comisión Europea financió el **proyecto MR-TB** para el período 2005-2007 permitiendo implementar una vigilancia específica de la TB-MR con un componente de tipificación molecular. Se consideró la necesidad de monitorizar estrechamente la transmisión potencial de esta forma grave de tuberculosis que presenta una morbilidad elevada y graves consecuencias en términos de control de la enfermedad.

El establecimiento de la vigilancia de la TB-MR en Europa se espera que sirva para reforzar el desarrollo de principios de colaboración y de manejo de los clusters europeos de tuberculosis y otros eventos relacionados de interés, así como para preparar una vigilancia de la tuberculosis orientada a la acción. El proyecto también debe permitir el intercambio de información y contribuir a desarrollar estándares europeos para la investigación de contactos de tuberculosis y manejo de brotes, un área clave de acción para el progreso hacia la eliminación de la tuberculosis en los países de la UE.

### Objetivos

1. Describir la prevalencia e incidencia de la TB-MR en Europa,
2. Describir y monitorizar los genotipos de cepas del complejo *M. tuberculosis* multirresistentes circulantes por Europa y países asociados,
3. Identificar las cepas de TB-MR en clusters moleculares internacionales para llevar a cabo acciones coordinadas de control.

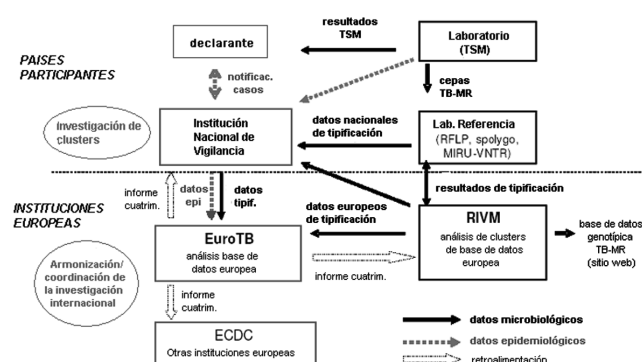
### Métodos

#### Recogida y manejo de datos (figura 1)

Los Institutos nacionales de vigilancia, en España el Centro Nacional de Epidemiología (CNE), proporcionan

Figura 1

#### Proyecto MR-TB. Red de Vigilancia de la Tuberculosis Multirresistente en Europa. Circuito de información



Fuente: EuroTB. Molecular surveillance of multi-drug resistant tuberculosis in Europe (MDR-TB Surveillance). Project outline, January 2006.

a EuroTB información anónima e individualizada de los casos de TB-MR. Esta información incluye variables epidemiológicas, clínicas y genéticas y se actualiza trimestralmente.

Los resultados de la tipificación molecular se envían desde los laboratorios nacionales, en nuestro caso el Grupo de Genética de micobacterias de la Universidad de Zaragoza, a los Institutos nacionales de vigilancia y al RIVM de Holanda. Este realiza la coordinación y el análisis de la base de genotipos europeos con el objetivo principal de identificar y describir clusters europeos de TB-MR.

### Tipificación molecular

La técnica de referencia utilizada para la tipificación molecular es el análisis del ADN por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) mediante la identificación de la secuencia de inserción IS6110<sup>5</sup>.

Se utilizan métodos de subtipificación en aquellas cepas que por RFLP presentan bajo número de copias (menos de seis). Estos son Spoligotyping (también utilizado para tipar cepas de *M. tuberculosis* del genotipo Beijing) y MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Numbers of Tandem Repeats) de acuerdo con protocolos estandarizados. Aquellos países que utilizan estas dos técnicas como métodos de referencia, también deben realizar la subtipificación por RFLP- IS6110.

### Definiciones

Se define como caso de TB-MR a una persona con diagnóstico de tuberculosis, confirmado por cultivo y aislamiento de una cepa de *M. tuberculosis* complex, resistente al menos a Isoniazida y Rifampicina. Cuando se obtiene un nuevo aislamiento en un mismo paciente, 24 meses después del primero, se notifica de nuevo. Se incluyen los casos diagnosticados en alguno de los países participantes desde el 1 de enero de 2003. Se estableció una definición específica para el genotipo Beijing, siguiendo estudios previos<sup>6</sup>.

Se utiliza la definición modificada de la OMS para caso de TB-XR, caso de TB-MR resistente al menos a una fluoroquinolona (ofloxacino o ciprofloxacino) y a un antituberculoso inyectable (amikacina, kanamicina o capreomicina).

Se define como cluster, dos o más casos de TB-MR con idéntico patrón por RFLP-IS6110, o, en cepas con menos de seis bandas del patrón RFLP-IS6110, aquellas que compartan el mismo patrón de Spoligotipo o MIRU-VNTR. Cluster nacional, cuando incluye casos diagnosticados en un mismo país, y Cluster europeo, cuando los casos sean diagnosticados en, al menos, dos de los países participantes.

### Participación española

En España, las instituciones que participan en el Proyecto son el CNE, del Instituto de Salud Carlos III; el Laboratorio de micobacterias del Centro Nacional de Microbiología, del Instituto de Salud Carlos III, donde se realizan las pruebas de sensibilidad a fármacos, y el Grupo de Genética de micobacterias de la Universidad de Zaragoza, como laboratorio nacional, que viene realizando la caracterización genética de las cepas de tuberculosis multirresistentes por las tres técnicas requeridas en el proyecto. El CNE, además de actuar de

punto de contacto para la transmisión de la información, trabaja en coordinación con los Servicios de Epidemiología de las Comunidades Autónomas para completar, siempre que sea necesario, la información de los casos multirresistentes detectados por el laboratorio y en caso de que se detectara una alerta que requiriera investigación.

### Resultados

El último informe del proyecto MR-TB<sup>7</sup>, presenta datos de 24 países (17 con información genética) para el período 2003-2006. El número total de casos de TB-MR recogidos en este período fue de 2.220. De los 561 casos con información completa, las principales características epidemiológicas se muestran en la tabla 1, presentándose en dos grupos en función de encontrarse o no en cluster. Hay que señalar un predominio del sexo masculino (70%) en ambos grupos, con una media de edad de 6 años superior al femenino, en los casos no agrupados en cluster ( $p < 0,005$ ); en los casos en cluster la media de edad no mostraba diferencias significativas entre ambos sexos. La localización más frecuente de la enfermedad fue la pulmonar (92%) en ambos grupos. Es de destacar que el 87% de los casos agrupados en clusters procedían de las Ex - Repúblicas Soviéticas (incluidos los Estados Bálticos Lituania, Letonia y Estonia), mientras que en los no agrupados esta proporción fue del 37%.

De los 2.220 casos, sólo 604 (27%) disponían de patrones IS6110 RFLP para poder identificar clusters europeos; de éstos, se detectaron 280 cepas (46%) distribuidas en 15 clusters. Seis clusters europeos estuvieron producidos por cepas del genotipo Beijing, entre ellos los tres de mayor tamaño, que agrupaban en total 228 casos distribuidos en 11 países. Indicar que la mayoría de los casos incluidos en estos tres clusters procedían de las Ex - Repúblicas Soviéticas (165 casos en el primero, 28 en el segundo, y 14 en el tercero).

Tabla 1

#### Proyecto MR-TB, Vigilancia Europea de Tuberculosis Multirresistente. Características epidemiológicas de los casos según resultados del análisis genético\*

	Agrupados en cluster N=261	No agrupados en cluster N=300
<b>Sexo</b>		
Hombre	179 (69%)	209 (70%)
Mujer	82 (31%)	89 (29%)
desconocido	0 (0%)	2 (1%)
<b>Edad media (años)</b>	43	39
Hombres	44	41
Mujeres	40	35
<b>Origen</b>		
Ex Repúblicas Soviéticas	227 (87%)	112 (37%)
Europa	12 (5%)	58 (19%)
África	14 (5%)	52 (17%)
Asia	1 (0%)	30 (10%)
Otros	0 (0%)	15 (5%)
desconocido	7 (3%)	33 (11%)
<b>Localización enfermedad</b>		
Pulmonar	248 (95%)	269 (90%)
Extrapulmonar	12 (5%)	27 (9%)
desconocido	1 (0%)	4 (1%)

\* De 604 cepas con patrones IS6110 RFLP para poder identificar clusters, se disponía de información epidemiológica en 561 casos notificados por 15 países.

Fuente: EuroTB. Molecular surveillance of multi-drug resistant tuberculosis in Europe (MDR-TB Surveillance). Report n.º 6, March 2007. ([http://www.eurotb.org/mdr\\_tb\\_surveillance/pdf/MDR-TB\\_report6.pdf](http://www.eurotb.org/mdr_tb_surveillance/pdf/MDR-TB_report6.pdf)).

España se incorporó a este Proyecto en Mayo de 2006, se han aportado 50 aislamientos (28 correspondientes a 2004 y 22 a 2005), todos con información epidemiológica y molecular. Catorce casos estaban incluidos en algún cluster y 36 eran cepas con patrón único. Las principales características de estos casos se muestran en la tabla 2. El 71% eran hombres, con una edad media superior a las mujeres, especialmente en los casos agrupados en cluster con una diferencia de casi 20 años ( $p < 0,001$ ). El 71 y 97% de los casos presentaban una localización pulmonar, en los casos agrupados en cluster, frente a los no agrupados. Respecto al país de origen, señalar que el 50% de los casos eran de origen extranjero en ambos grupos. De los casos nacidos fuera de España, destacan como zonas de procedencia África para los incluidos en clusters (5 casos, de los que 3 eran de Marruecos), e Hispanoamérica para los no agrupados (7 casos). De los 14 casos agrupados en cluster, cinco formaban parte de un cluster internacional.

Tabla 2

**Proyecto MR-TB. Características de los casos de tuberculosis multirresistente notificados por España**

	Agrupados en cluster N=14	No agrupados en cluster N=36
<b>Sexo</b>		
Hombre	10 (71%)	26 (72%)
Mujer	4 (29%)	10 (28%)
<b>Edad media</b>		
Hombres	41 años	43 años
Mujeres	20 años	34 años
<b>Origen</b>		
España	6 (43%)	14 (39%)
Hispanoamérica	2 (14%)	7 (20%)
África	5 (36%)	2 (5%)
Rumanía	0 (0%)	5 (14%)
Fed Rusa y ex Repúblicas Soviéticas	0 (0%)	4 (11%)
China	0 (0%)	1 (3%)
desconocido	1 (7%)	3 (8%)
<b>Localización enfermedad</b>		
Pulmonar	10 (71%)	35 (97%)
Extrapulmonar	4 (29%)	1 (3%)

## Conclusiones

Si bien los resultados presentan limitaciones debido a la cobertura y diversidad de los sistemas de vigilancia de los distintos países participantes, este proyecto facilita una aproximación a la situación de la tuberculosis multirresistente en Europa, permite poner de relieve los principales problemas a los que nos enfrentamos cara al control de la misma, e identificar zonas geográficas «calientes» con elevado porcentaje de resistencias que incluyen casos de TB-XR. También ha puesto de manifiesto la heterogénea circulación de cepas en Europa, la identificación de quince clusters internacionales, y confirmar la mayor transmisibilidad del genotipo Beijing, responsable de los clusters de mayor tamaño y que afectan a un número elevado de países.

En el ámbito europeo, las Ex-Repúblicas Soviéticas son una clara prioridad para el control de la tuberculosis, debido, principalmente, al elevado porcentaje de resistencias. Este hecho, así como el gran número de fallos en el tratamiento antituberculoso, probablemente sea debido a unos regímenes terapéuticos inadecua-

dos, como ha señalado EuroTB<sup>7</sup>. Resaltar que una de las recomendaciones de la Red es implementar en Europa sistemas de vigilancia de la tuberculosis resistente, bien mediante la recogida continuada de los resultados de las pruebas de sensibilidad de todos los casos iniciales, o a través de encuestas periódicas de prevalencia.

Finalmente señalar que, para España, la participación en el Proyecto ha permitido afianzar la colaboración del Centro Nacional de Epidemiología con el Grupo de Genética de micobacterias de la Universidad de Zaragoza, facilitando la detección de clusters entre Comunidades Autónomas y, otros, que afectan a países europeos. Los datos de España señalan un predominio de Hispanoamérica y África como principales zonas de procedencia de los casos multirresistentes de origen extranjero.

## Agradecimientos

Queremos expresar nuestro agradecimiento a los Servicios de Epidemiología de las Comunidades Autónomas por su colaboración para completar la información de los casos y a los laboratorios de microbiología del Grupo Español de Trabajo de Tuberculosis Multirresistente.

## Bibliografía

1. EuroTB (InVS/KNCV) and the national coordinators for tuberculosis surveillance in the WHO European Region. Surveillance of tuberculosis in Europe. Report on tuberculosis cases notified in 2005, Institut de Veille Sanitaire, Saint-Maurice, France. March, 2007.
2. Schwoebel, V., Lambregts-van Weezenbeeck C. S. B., Moro M. L., et al. Standardisation of antituberculosis drug resistance surveillance in Europe. Recommendations of a World Health Organization (WHO) and International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) Working Group. *Eur Resp J* 2000; 16: 364-371.
3. Broekmans, J. F., G. B. Migliori, H. L. Rieder, et al. European framework for tuberculosis control and elimination in countries with a low incidence. Working group report. *Eur Respir J* 2002; 19: 765-775.
4. Clustering of multi-drug resistant tuberculosis cases from nine European countries, 1998-2001. Final study report. <http://hypocrates.rivm.nl/bnwww/DRAFT%20Report%20RIVMvers010304.doc> Accessed 25 April 2005.
5. Van Embden, J. D. A., J. T. Crawford, J. W. Dale, B. Gicquel, P. W. M. Hermans, R. McAdam, T. Shinnick, and P. M. Small. 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31:406-409.
6. Kremer, K., J.R. Glynn, T. Lillebaek, S. Niemann, N.E. Kurepina, B.N. Kreiswirth, P.J. Bifani, and D. van Soolingen. Definition of the Beijing/W lineage of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of genetic markers. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42:4040-4049.
7. EuroTB. Molecular surveillance of multi-drug resistant tuberculosis in Europe (MDR-TB Surveillance). Report n° 6, March 2007. [http://www.eurotb.org/mdr\\_tb\\_surveillance/pdf/MDR-TB\\_report6.pdf](http://www.eurotb.org/mdr_tb_surveillance/pdf/MDR-TB_report6.pdf).