



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

"DISCORDANCIA ENTRE LAS CEPAS
DEL CASO ÍNDICE DE TUBERCULOSIS
Y LOS CASOS SECUNDARIOS DENTRO
DEL HOGAR. VENTANILLA –
CALLAO”

Tesis para optar el grado de
Doctor en Salud Pública

Karine Zevallos Villegas

Lima - Perú

2017

ASESOR:

CÉSAR CÁRCAMO CAVAGNARO

DEDICATORIA

A Dios por todo lo que me ha brindado

A mi esposo e hija por darle sentido a mi vida

A mis padres y hermanos por existir

AGRADECIMIENTO

A los pacientes con Tuberculosis de Ventanilla por apoyar en el desarrollo de la ciencia, al Dr. Carlton Evans por compartir su conocimiento y haberme invitado a iniciarme como médico investigador, a mis ex compañeros de trabajo de IFHAD por compartir horas interminables de trabajo y amistad en la lucha contra la Tuberculosis.

Fuente de financiamiento: Recursos propios

Tabla de Contenidos

INTRODUCCIÓN	1
I Planteamiento de la Investigación	3
1.1 Planteamiento del problema.....	3
Formulación del problema de investigación	5
Problema General.....	5
Problemas específicos	5
1.2 Marco teórico	6
Definición de términos básicos	15
1.3 Justificación del estudio	16
II Objetivos	19
2.1 Objetivo general	19
2.2 Objetivos específicos	19
III Metodología	20
3.1. Diseño del estudio	20
3.2. Población y muestra	25
Criterios de inclusión	25
Criterios de exclusión.....	25
3.3 Operacionalización de variables	27
3.4. Procedimientos y técnicas	29
3.5 Consideraciones éticas	29
3.6 Análisis.....	29
IV Resultados	32
V Discusión.....	44
VI Conclusiones	51
VII Recomendaciones	53
VIII Referencias	54
Anexos	61

Índice de Tablas

Tabla 1: Recategorización ad hoc de variables nominales socioeconómicas.....	25
Tabla 2: Características demográficas de la población de estudio	32
Tabla 3: Características de laboratorio del caso índice y del caso secundario	34
Tabla 4: Características socioeconómicas del hogar.....	35
Tabla 5: Valores de los vectores propios de las variables socioeconómicas del modelo final.....	38377
Tabla 6 : Análisis univariado entre las características de los casos y la discordancia de espoligotipos entre el caso índice y el caso secundario.....	388
Tabla 7: Análisis multivariado entre las características de los casos y la discordancia de espoligotipos entre el caso índice y el caso secundario.....	399
Tabla 8: Análisis univariado entre características de los casos y la discordancia de susceptibilidad a drogas específicas.....	40
Tabla 9: Análisis univariado de las características de los casos y la discordancia de cepas (espoligotipificación y pruebas de susceptibilidad).....	41

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Distribución de la edad del caso índice y del caso secundario.....	32
Gráfico 2: Factores asociados a la discordancia de cepas entre el caso índice y caso secundario en el hogar.....	42

RESUMEN

Introducción: Se considera que el caso secundario de Tuberculosis en el hogar es consecuencia del caso índice. Sin embargo, existe evidencia de contactos con cepas discordantes. Por lo descrito, nuestro estudio evaluó la discordancia entre cepas de TB del caso índice y caso secundario en el contexto del hogar y los factores asociados.

Metodología: Se determinó la discordancia de cepas de TB entre 81 casos índices y 90 casos secundarios dentro del hogar mediante la técnica de “spoligotyping” y susceptibilidad a drogas anti TB. Se analizaron datos demográficos, socioeconómicos y de laboratorio ligados a las muestras. Se usó el modelo lineal generalizado (GLM) ajustado por agrupamiento a nivel hogar.

Resultados: El 38% (34/90) de las cepas de los casos secundarios fueron discordantes con respecto a la cepa del caso índice. La discordancia de cepas se asoció independientemente a una diferencia de menos de 6 meses entre el diagnóstico del caso índice y del caso secundario (RR [IC95%]: 2.62, [1.34-5.13], $p=0.005$) y baciloscopia negativa del caso índice (1.63[1.08-2.45], $p=0.019$)

Conclusiones: Una proporción importante de las cepas aisladas de casos secundarios no están relacionadas a la cepa del caso índice, lo que sugiere que no corresponden a transmisión intradomiciliaria. Estos hallazgos nos brindan un diagnóstico inicial para una revisión de las políticas de salud relacionadas al abordaje preventivo de TB.

Palabras claves: Tuberculosis, transmisión, biología molecular

ABSTRACT

Background: Tuberculosis contact screening generally assumes that TB clustering in household contacts results from recent household transmission of the same strain. However, recent studies demonstrated discordance among TB strains. In this study, we aimed to evaluate the discordance between TB strains from index and secondary cases in household clusters and associated factors.

Methods: We studied TB strains from 81 index cases and 90 secondary cases. TB strains were compared for drug susceptibility testing and by spoligotyping. Additionally, risk factors related with the samples were analyzed. Statistics were done using Generalized linear model (GLM) adjusted by household.

Results: In 38% (34/90) the TB strains from index case and secondary cases had discordant spoligotypes and/or drug-susceptibilities. Discordance was more likely for cases occurring within 6 months after the index case (RR [IC95%]: 2.62, [1.34-5.13], $p=0.005$) and sputum-microscopy negative index patients (1.63[1.08-2.45], $p=0.019$)

Conclusions: An important proportion of TB strains from secondary cases were discordant with index case, which suggests other pathways of TB transmission.

Key words: Tuberculosis, transmission, molecular biology.

LISTA DE ACRÓNIMOS

TB Tuberculosis

SNPs Single Nucleotide Polymorphisms

ADN Ácido Desoxirribonucleico

VIH Virus de Inmunodeficiencia Humana

DR Repeticiones Directas

MDR Multidrogo Resistente

XDR Extremadamente Resistente

PC Componentes principales

INTRODUCCIÓN

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad que se transmite de persona a persona a través de la inhalación de *M. Tuberculosis* presente en gotas que son expulsadas durante la tos. Un paciente con TB antes de ser diagnosticado y tratado puede transmitir la enfermedad sobre todo a los contactos cercanos, generalmente personas que co-habitan el mismo hogar.(1)

Al primer caso de TB diagnosticado en el hogar o durante un brote se le denomina caso índice y se denomina caso secundario a un contacto que desarrolló la enfermedad a partir del tercer mes de haber estado en contacto con el caso índice.(2) Por lo tanto, teniendo como contexto el hogar, el caso secundario sería consecuencia del caso índice y por ende compartirían la misma cepa Tuberculosa.(2)

Sin embargo, en países con baja prevalencia de TB algunos estudios utilizando pruebas moleculares han demostrado que durante brotes en los cuales se estudian contactos cercanos, los grupos afectados no siempre comparten la misma cepa de TB.(3) Lo mismo sucede cuando se comparan cepas de casos relacionados o que provienen de un mismo conglomerado de lugares con alta prevalencia de TB.(4)

Esta falta de concordancia entre las cepas del caso índice y del caso secundario puede explicarse por una infección comunitaria es decir que estas personas se infectaron fuera del hogar, re-infecciones exógenas durante el tratamiento del caso índice, cambios en el ADN del bacilo, infecciones mixtas o reactivación de una TB latente.(1, 5, 6)

Las guías nacionales para el control de la TB no contemplan otras alternativas, además de la transmisión reciente, para explicar TB en conglomerados como el hogar.(2) Posiblemente porque no se ha demostrado suficientemente la extensión de la misma con datos nacionales a partir de un estudio de cohorte como lo propuso nuestra tesis.

Bajo este contexto, se presentan resultados sobre la discordancia entre cepas del caso índice y del caso secundario dentro de un hogar luego de aplicar pruebas moleculares y analizar factores de riesgo relacionados al conglomerado del hogar que contribuyen a la discordancia entre cepas.

I.- PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 Planteamiento del problema

Los pacientes con tuberculosis (TB) pulmonar emiten aerosoles infecciosos al medio ambiente que los rodea a través de la tos, y de ésta manera infectan aproximadamente a la mitad de los cohabitantes del hogar. Los contactos expuestos al bacilo de Koch generalmente desarrollan infección latente. Entre el 5% al 10% de personas inmunocompetentes con TB latente se convertirán en un caso de TB secundario en el hogar, mientras que en las personas inmunodeprimidas o coinfectadas con VIH se espera que casi la mitad desarrollen TB. (7, 8)

Según la norma técnica peruana, la sensibilidad a medicamentos anti TB del caso índice es la base para decidir la estrategia de terapia preventiva con isoniacida y el número de evaluaciones que el personal médico realizará para lograr contactos controlados. Esta discriminación influye en la quimioprofilaxis con isoniacida, y tratamiento específico contra TB sensible o resistente.(2)

Los exámenes de rutina que se establecen en la norma técnica peruana se basan en la asunción de que los casos secundarios de TB en el hogar se deben a una transmisión reciente originada por el caso índice del hogar. Bajo esta misma premisa, el caso índice y el caso secundario deberían compartir la misma cepa tuberculosa, y por tanto el mismo patrón de susceptibilidad.

En consecuencia, las decisiones médicas relacionadas a la quimioprofilaxis preventiva y el tratamiento empírico de los casos secundarios de TB en el hogar, se basan en la susceptibilidad antibiótica del caso índice. Esta afirmación es probablemente válida para poblaciones con bajo riesgo de exposición extradomiciliaria, porque en estos lugares el caso índice es la única fuente de exposición de enfermedad tuberculosa para sus contactos.(9)

Sin embargo, en áreas con alta incidencia de TB, planteamos tres circunstancias que podrían discrepar con la afirmación de que un caso secundario se debe siempre a una transmisión reciente y que comparta la misma cepa con el caso índice:

Primero, TB se encuentra generalmente concentrada en zonas económicamente desfavorecidas como los asentamientos humanos que rodean Lima, donde muchos de los residentes adultos tienen una infección latente tuberculosa (7, 10), por lo que muchos de los casos secundarios de TB pueden ser explicados por una posible reactivación de una Tuberculosis latente pre existente.

Segundo, TB está fuertemente asociada a la pobreza y a retos socioeconómicos que las familias deben afrontar como son: acceso a una adecuada nutrición, estrés, uso de drogas y cambios en el hogar que pueden dar como resultado inmunodepresión (11); estos retos socioeconómicos podrían permitir que la tuberculosis latente progrese a enfermedad tuberculosa en más de un miembro del hogar.

Tercero, algunos estudios sugieren que la presencia de TB en varios miembros de un hogar no necesariamente implica una transmisión reciente de TB y que la transmisión de cepas multidrogo resistentes difiere de las cepas sensibles, especialmente en comunidades pobres donde la TB es prevalente.(12, 13)

Basado en lo anterior podemos deducir dos planteamientos que expliquen la enfermedad tuberculosa en los contactos. Primero que los casos secundarios de TB se deban a una transmisión reciente teniendo como fuente de contacto al caso índice del hogar y segundo que una parte de los casos secundarios se deban a otras causas como la reactivación de una infección latente, infecciones exógenas, infecciones mixtas o cambios en el ADN del bacilo.

Para hallar la discordancia entre las cepas que se aíslan de las muestras de esputo de los pacientes con enfermedad tuberculosa en el hogar se puede (i) comparar la susceptibilidad a drogas de las cepas, o (ii) emplear técnicas moleculares como la

detección de espoligotipos (mediante la técnica de spoligotyping o spacer oligonucleotide typing), la cual permite comparar la presencia o ausencia de alguna de las 43 secuencias espaciadoras localizadas en la región de las repeticiones directas (DR) de *M. tuberculosis* . (14) El uso simultaneo de éstas dos técnicas para comparar las cepas entre el caso índice y los casos secundarios en el hogar, podría proporcionar resultados robustos sobre la discordancia en comparación del uso de sólo una de ellas .(15)

Con estos resultados, podemos asumir que los casos secundarios originados por la misma cepa corresponden a una probable transmisión reciente, mientras que los casos secundarios causados por cepas diferentes y/o con diferente susceptibilidad a drogas corresponden a una reactivación de tuberculosis latente o una infección reciente a partir de un caso índice fuera del hogar.

Por lo descrito, decidimos estudiar los casos secundarios de tuberculosis dentro del hogar, y evaluar la discordancia entre las cepas de TB del caso índice y las cepas del caso secundario. Nuestra hipótesis sostiene que existe discordancia entre las cepas del caso índice y del caso secundario en el hogar, abriendo la puerta a otras hipótesis como cambios en el ADN, infecciones comunitarias, infecciones mixtas o la reactivación por factores socioeconómicos cuando existan dos casos o más casos de TB en un hogar. Se han publicado previamente resultados parciales de un análisis preliminar con los mismos datos utilizados para esta tesis que han sustentado nuestra hipótesis.(16)

Formulación del problema de investigación

Problema General

¿Cuál es la discordancia entre las cepas del caso índice de Tuberculosis y los casos secundarios dentro del hogar?

Problemas específicos

- 1.- ¿Cuál es la discordancia entre las cepas del caso secundario y del caso índice de enfermedad Tuberculosa dentro del hogar mediante la técnica de espoligotipificación?
- 2.- ¿Cuál es la discordancia entre las cepas del caso secundario y del caso índice de enfermedad Tuberculosa dentro del hogar mediante el estudio de susceptibilidad a drogas anti TB?
- 3.- ¿Cuáles son los factores que contribuyen a la discordancia entre las cepas del caso índice de Tuberculosis y los casos secundarios dentro del hogar?

1.2 Marco teórico

La TB es una enfermedad que ha afectado a la humanidad desde épocas remotas y hasta la actualidad sigue siendo causa de una importante discapacidad, mortalidad y estigma social. (7) Hasta la mitad del siglo XIX se ignoraba su mecanismo de transmisión y se creía que la enfermedad era hereditaria. No se pensaba que la transmisión podría ser de persona a persona a través del aire. En 1865 el cirujano francés, Jean-Antoine Villemin probó que la TB era contagiosa, y en 1882 el científico alemán Robert Koch descubrió al bacilo causante de la TB. (1)

Un reservorio fundamental para la endemia es el hombre sano infectado sin sintomatología clínica portador de bacilos vivos en fase latente. Mientras que un enfermo de TB no diagnosticado o crónico resistente es el reservorio capaz de transmitir o reinfectar a otra persona *M. tuberculosis*, diseminando la enfermedad. La tendencia actual es considerar tres escenarios para entender la epidemiología de la TB: 1. La exposición a personas con enfermedad tuberculosa, 2. la infección con el bacilo de Koch y 3. el desarrollo de síntomas de la enfermedad Tuberculosa la cual podría curarse o causar la muerte del enfermo. (2)

Sin embargo, no toda persona expuesta a un paciente infectante se infecta o enferma de TB. Esta probabilidad dependerá de a) cuán infeccioso o contagioso es el caso índice, b) la virulencia del bacilo, c) el tiempo de exposición y d) el tipo

de ambiente en el que ocurre la exposición, y quizás otros factores contextuales e individuales como la susceptibilidad del paciente (11, 17) y factores socioeconómicos del hogar. (18, 19)

La infección depende sólo de uno a 3 bacilos contenidos en la gota de Pflüger y los pacientes con mayor cantidad de bacilos en el esputo pueden transmitir TB con mayor frecuencia. La primera infección se produce con la llegada del bacilo al pulmón, siendo más frecuente en los tercios medios e inferiores, lo cual desencadena primero una inflamación inespecífica, segundo una respuesta monocitaria y finalmente una bacteremia silenciosa que se asienta en el actualmente llamado sistema fagocítico-monocular. (1)

El reconocimiento de las variaciones fenotípicas, gracias al descubrimiento de regiones variables del genoma de TB y a los métodos moleculares desarrollados desde 1990, ha permitido desarrollar estudios epidemiológicos de TB y así entender mejor las dinámicas de transmisión. La epidemiología molecular ha evidenciado que los diferentes genotipos tienen propiedades biológicas distintas. Por ejemplo, la virulencia de las diferentes cepas de TB es variable y puede ser modificada según esquemas de tratamiento como es el caso de las cepas resistentes a isoniacida. Actualmente se conoce que la cepa Beijing es la de mayor virulencia y por ende es de mayor importancia epidemiológica. Asimismo, se conoce que algunas cepas se diseminan con mayor rapidez en algunas poblaciones, otras transmiten más la infección y otras poseen mayor capacidad de causar enfermedad. (1)

Adicionalmente, nos ha permitido evidenciar infecciones mixtas y profundizar en el fenómeno de la micro evolución de las cepas de TB. Se denomina infección mixta a la infección en la cual un paciente está coinfectado con dos cepas diferentes, generalmente una primera cepa que aún no ha podido ser controlada por el tratamiento y una segunda cepa de otro paciente. Las infecciones mixtas son más comunes en prisiones, refugios, viviendas hacinadas y en comunidades sobre expuestas a TB. Las infecciones mixtas pueden complicar los resultados de una

prueba de sensibilidad y en lugares donde las infecciones mixtas son comunes, existe mayor resistencia al tratamiento.(6)

El fenómeno de micro evolución de las cepas consiste en variaciones del ADN original de la cepa y se confirman cuando la variación entre clonas de cada episodio de TB sólo difieren en un solo locus. Recientemente se ha publicado que el grado de variabilidad entre clonas de TB en muestras de un mismo paciente fue de 11 SNPs, cuando se espera una mutación anual del genoma en un rango de 0.25–0.5 SNPs. Sugiriendo una alta tendencia a la variabilidad de las cepas de un paciente o que parte de esta variabilidad ha sido adquirida durante el periodo de latencia de TB. (5)

En 1997, Kamerbeek desarrolló un método simple denominado “Spoligotyping” que permite simultáneamente la detección y tipificación de TB en muestras clínicas y que tiene la capacidad de reducir el tiempo a uno o tres días entre la sospecha clínica y la tipificación. (20) Sin embargo, actualmente existen técnicas más complejas y costosas como MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–Variable Number Tandem Repeat) , RFLP (IS6110-restriction fragment length polymorphism) y el estudio de todo el genoma las cuales permiten una mayor discriminación entre cepas.(5)

En una revisión de la literatura publicada en el 2009, Rieder resaltó la importancia de las pruebas moleculares para el estudio de cepas en la transmisión de TB altamente resistente, en la transmisión intranosocomial y en la transmisión comunitaria. Asimismo, remarcó la importancia de la utilización de pruebas moleculares como herramienta para identificar factores de riesgo que contribuyen a la transmisión de TB, detectar las debilidades de los programas nacionales contra la TB, controlar los contactos y el manejo de casos. La aplicación molecular para el estudio de brotes de TB en países como Uganda, Japón, Finlandia y Austria permitieron evidenciar la dinámica de la transmisión en diferentes grupos humanos, así como revelar características epidemiológicas propias como la identificación de una cepa denominada Genotipo Uganda. (21)

Los contactos cercanos del paciente con TB presentan mayor riesgo de infectarse y esta susceptibilidad aumenta cuando estos contactos presentan alteraciones inmunitarias. A partir de una cohorte histórica de 10 años, un estudio desarrollado en Ventanilla – Callao (el mismo lugar de estudio de donde provienen los datos de esta tesis) determinó que la exposición continua al caso índice es un factor de riesgo asociado al desarrollo de enfermedad tuberculosa en contactos intradomiciliarios. Otros factores identificados fueron: Índice de masa corporal, tuberculosis previa, edad, caso índice masculino, nivel socioeconómico bajo, historia de tratamiento de tuberculosis en el hogar y vivir con poco número de ventanas.(22)

La mejor estrategia para reducir la transmisión y evitar el desarrollo de la enfermedad es brindar tratamiento antibiótico oportuno al caso índice del hogar. (2) La elección del tratamiento adecuado para el contacto debe considerar la resistencia a drogas. La resistencia a fármacos anti tuberculosos se denomina primaria si la cepa resistente se transmite de persona a persona. La resistencia secundaria, es aquella que se desarrolla durante el tratamiento anti tuberculoso, ya sea porque el paciente no fue tratado con el régimen adecuado o porque el paciente no siguió el tratamiento indicado. El patrón de resistencia del caso índice no siempre es compartido con el contacto cercano, es decir, dos personas en un conglomerado no necesariamente comparten bacilos con la misma susceptibilidad. (12, 23)

Las cepas resistentes de *M. tuberculosis* se clasifican de la siguiente manera: TB monoresistente si el bacilo tuberculoso es resistente a alguna de las drogas del régimen recomendado, multi resistente si es resistente al menos a dos drogas pero no isoniacida y rifampicina a la par, multidrogo resistente (MDR) si es resistente a isoniacida y rifampicina y extensivamente resistente (XDR) si el bacilo es resistente a isoniacida, rifampicina y al menos a una fluoroquinolona o al menos a tres drogas inyectables de segunda línea como amikacina, kanamicina y capreomicina.(2)

Además de la transmisión de persona a persona, la TB puede desarrollarse como resultado de la reactivación de la infección endógena primaria, o como resultado de una reinfección exógena. (24) La reactivación de la Tuberculosis puede ocurrir en contactos durante el desarrollo de un brote. En tales situaciones, las investigaciones tradicionales de contactos pueden sobreestimar la tasa de transmisión sobre todo cuando los cultivos y patrones de susceptibilidad no se encuentran disponibles y se asume que el contacto comparte la misma cepa que el caso índice. La correcta identificación del patrón de resistencia del bacilo es especialmente importante para el adecuado tratamiento y en el estudio de personas con varios factores de riesgo para la infección. (25, 26)

Sin embargo, hablar de reactivación implica que la persona presentó una TB latente y que la TB estuvo inactiva. Es decir, desde la fase donde no se halla ningún rastro de TB hasta el periodo de incubación con replicación en ausencia de síntomas. De la misma manera como enfermedad puede ir en un rango de infección activa sub clínica, hasta cavidades con grandes cantidades del bacilo que se replican para expandirse a zonas extra pulmonares o convertirse en TB miliar. (27)

A nivel ambiental, el cambio climático es una variable de interés que debe ser incluida en los estudios epidemiológicos. El cambio climático es una realidad que se vive a nivel mundial y los efectos en la incidencia de diversas enfermedades ha sido declarado por la Organización Mundial de la Salud. El cambio climático, caracterizado por alteraciones de condiciones climatológicas como lluvias y temperatura ambiental, desencadena daños enormes a centros poblados. Estos desastres naturales pueden incrementar la pobreza, el hacinamiento y la inseguridad alimentaria de los países afectados, sobre todo de los más pobres, creando condiciones para la transmisión y reactivación de la TB. Adicionalmente, el cambio climático puede alterar la estacionalidad de las enfermedades entre ellas la relacionada a la absorción de micronutrientes como la vitamina D relacionada con la susceptibilidad a la TB. (28)

Las pruebas moleculares nos permiten evaluar factores de riesgo individuales y ambientales que influyen en el desarrollo de la enfermedad tuberculosa. La

transmisión de persona a persona sigue siendo importante sin embargo cuando ocurren varios casos de TB en el hogar, se sugiere que el hogar puede ser un complejo sistema de interacción entre riesgos individuales y contextuales para el desarrollo de la enfermedad tuberculosa. (29)

La investigación de contactos del caso índice de un hogar exige recursos humanos y económicos sobre todo en áreas de gran prevalencia de TB. Los resultados obtenidos a partir de estudios epidemiológicos pueden apoyar a mejorar las medidas de intervención de los programas nacionales de lucha contra TB. Debido a que a partir de la información epidemiológica es posible construir modelos predictivos para intervenciones que optimicen los recursos estatales (30)

Actualmente la mayor concentración de casos de TB se encuentra en la ciudad de Lima y Callao seguido de regiones como Loreto, Ica y Madre de Dios. El artículo primero del capítulo I sobre derechos fundamentales de la constitución política refiere que “La defensa de la persona humana y el respeto de su dignidad son el fin supremo de la sociedad y del Estado”. Al respecto la Norma Técnica de Salud para el control de la Tuberculosis del Ministerio de Salud garantiza el acceso al diagnóstico y tratamiento oportuno a todas las personas sospechosas de tuberculosis. Sin embargo, el acceso a pruebas rápidas de diagnóstico de susceptibilidad a fármacos sólo está disponible en el Instituto Nacional de Salud en la ciudad de Lima y no se encuentra descentralizado.(2)

Con la finalidad de lograr un tratamiento adecuado, por ejemplo, brindar un tratamiento con un esquema con drogas de primera línea como rifampicina, isoniacida, etambutol y pirazinamida a un paciente con cepas sensibles a ser eliminadas por éstos fármacos y por ende ser curado, es necesario conocer la susceptibilidad a drogas.(2) La práctica común de brindar tratamiento de primera línea sin un resultado de susceptibilidad a drogas, a pesar de que la evidencia sugiere primo infecciones con cepas resistentes contradice las políticas de salud y consecuentemente agrava los indicadores de resistencia.(12)

Las políticas específicas de salud para el control de Tuberculosis aseguran un trabajo intersectorial con enfoque en derechos humanos, sin discriminación socioeconómica, de género u otros. (2) Entendiéndose por control la reducción de la incidencia de TB en la población general, lo cual incluye a los casos secundarios. Los casos secundarios dentro del hogar implican un abordaje de TB como un problema familiar y aunque la norma técnica peruana fomenta la promoción de intervenciones sin discriminación, la evidencia de intervenciones exitosas que contemplen determinantes sociales en hogares es escasa. (19)

La pobreza es un fenómeno complejo y multidimensional, razón por la cual existen múltiples definiciones y maneras de medirla. Tradicionalmente se ha definido la pobreza como privación material, medida mediante el ingreso o el consumo del individuo o la familia. Considerándose a la pobreza extrema o pobreza absoluta la falta de ingreso necesario para satisfacer las necesidades de alimentación básicas. Adicionalmente existe la definición de pobreza general o relativa, que es la falta de ingreso necesario para satisfacer tanto las necesidades alimentarias básicas como las necesidades no alimentarias básicas, tales como vestido, energía y vivienda.(31)

El Instituto nacional de estadística e informática (INEI) peruano define pobreza según los ingresos económicos personales y del hogar basándose en su utilidad por ser una medición objetiva es decir cuantitativa. Desde el 2013 se denomina pobreza extrema a una canasta de 155 soles y pobreza total a una canasta de 292 soles. Sin embargo, las encuestas utilizan definiciones restringidas de ingreso que algunas veces no comprende todos los ingresos como empleado que percibe un salario, alquileres, pensiones y otros ingresos.

Existe una tendencia de utilizar la tenencia de activos como medida del nivel socioeconómico y un índice de riqueza sería igual a la suma de los activos de las personas, donde cada activo tiene la misma ponderación. Este abordaje utiliza un análisis de reducción de dimensiones para construir un índice que permite agrupar a las personas por diferentes categorías como, por ejemplo, quintiles de riqueza.

Se aplica cuando no se tiene información o la información de ingresos y gastos es incierto (32) . Sobre las variables a elegir la gama es variada desde activos como un reloj, una televisión y una nevera, entre otros, así como la propiedad sobre la tierra, el tipo de sanitario, el número de habitaciones de la vivienda, la fuente de agua potable, ocupación y educación del jefe de hogar. Algunos clasifican las variables en al menos tres categorías: (i) acceso a servicios básicos como agua, (ii) indicadores de la calidad de la vivienda, y (iii) la tenencia de activos. Cabe notar que el uso de estas variables se basa en un criterio ad hoc mas no en un criterio técnico. (33)

Los indicadores son variables que intentan medir u objetivar en forma cuantitativa o cualitativa, sucesos colectivos con la finalidad de respaldar acciones políticas, evaluar logros y metas. La OMS los ha definido como "variables que sirven para medir los cambios". Ventanilla, lugar donde se desarrolló el presente estudio, en uno de los seis distritos que tiene la provincia constitucional del Callao - Perú y tiene las siguientes características sociodemográficas. Es el segundo distrito con mayor población en el Callao, el 75% de la población posee una vivienda propia, las paredes exteriores de las viviendas fabricadas de ladrillo o bloque de cemento representan el 37,4%, las viviendas donde lo que predomina en los pisos es el cemento es el 54%, el 23% posee sólo una habitación en su vivienda y el 35% de la población se abastece de agua por medio de la red pública de agua dentro de la vivienda. La población presenta porcentajes variables de tenencia de activos, es decir, bienes durables. Entre los evaluados tenemos la tenencia de radio, televisor, lavadora, refrigeradora que representan el 64,8%, 76,7%, 17,7% y 40% respectivamente. En cuanto a algún tipo de activo utilizado para comunicación el 92,6% de la población poseía algún tipo de teléfono celular o fijo para tal fin.(34)

La TB tiene un impacto severo en el empobrecimiento de los pacientes y de sus hogares. Los mayores factores que desencadenan el empobrecimiento son: La inhabilidad para trabajar debido a la enfermedad y su directo indirecto costo para el acceso de tratamiento y diagnóstico. Por lo tanto, TB también tiene un impacto de empobrecimiento social.(35)

El análisis de componentes principales es una técnica de análisis estadístico multivariado que se basa en la reducción de dimensiones de un conjunto de datos con un gran número de variables interrelacionadas entre sí. Esto se logra transformando los datos a un nuevo grupo de variables “creadas” o componentes principales (CP), que no están relacionados entre sí y que están ordenados de tal manera que el primer componente retiene la mayor variación presente en todas las variables originales. En términos matemáticos, “de un conjunto inicial de n variables relacionadas el análisis de componentes principales construye índices o componentes no relacionados entre sí, donde cada componente es una combinación ponderada lineal de las variables iniciales”. (32)

La fundamentación algebraica se basa en la contribución de cada componente principal que se observa en los “vectores propios” (“eigenvectors”) de la matriz de correlaciones o, si los datos originales están estandarizados por la matriz de covarianza. La varianza (λ) para cada componente principal está dada por los “valores propios” (“eigenvalues”) de los correspondientes vectores propios. Los componentes son ordenados de tal manera que el primer componente (CP1) explica la mayor cantidad de variabilidad en los datos originales, sujeto a la restricción de que la suma de los pesos al cuadrado es igual a uno. Como la suma de los valores propios es igual al número de variables en el conjunto inicial de datos, la proporción del total de variación en los datos originales representada por cada componente principal está dada por λ_i/n .

El segundo componente (PC2) no tiene relación con el primer componente y explica variabilidad adicional que el primer componente y de manera subsecuente los siguientes componentes. Mientras mayor es el grado de correlación entre las variables se requiere menor cantidad de componentes para procesar todas las variables involucradas. (32)

Definición de términos básicos

Enfermedad tuberculosa: Enfermedad causada por la bacteria *M. tuberculosis*. Es la etapa de la enfermedad cuando el bacilo supera la barrera inmunológica del hombre infectado para desencadenar procesos patológicos y posteriores síntomas en el paciente.(2)

Tiempo: Tiempo transcurrido entre la fecha de diagnóstico del caso índice hasta que el contacto intradomiciliario desarrollo enfermedad tuberculosa probada es decir baciloscopia o cultivo positivo a *Mycobacterium tuberculosis*. (29)

Contactos intradomiciliarios: El contacto intradomiciliario es aquella persona que reside en el domicilio con el caso índice con enfermedad tuberculosa.(2)

Casos secundarios: Los contactos intradomiciliarios que pasaban al menos dos horas tres veces a la semana en el mismo hogar con un caso índice y desarrollaron enfermedad tuberculosa la cual fue confirmada por cultivo.(29)

Caso índice: Es el primer caso de enfermedad tuberculosa en la vivienda confirmado por cultivo positivo, al inicio del estudio de investigación original. (2)

Espoligotipos: Son el resultado de la técnica de biología molecular denominada “spoligotyping”. Este resultado se traduce en presencia o ausencia de barras en 43 oligonucleotidos previamente amplificados e hibridizados. (14)

Susceptibilidad a drogas: Resultado de pruebas que miden la susceptibilidad del bacilo tuberculoso frente a drogas anti – tuberculosas como isoniacida y rifampicina. (2)

Factores de riesgo socioeconómicos: Conjunto de características económicas y sociales del distrito de Ventanilla. Características que ayudarán a medir el nivel socioeconómico de la población de estudio. Se le considera una característica con una sola dimensión puesto que estas características pueden medir niveles

económicos y al mismo tiempo sociales. Los factores considerados fueron el acceso a servicios básicos, características de vivienda y hacinamiento.(34)

Índice de pobreza: Índice obtenido a partir del puntaje de las siguientes variables: sin servicio de agua potable pública, sin servicio de desagüe público o servicio de agua potable pública, electricidad de red pública, piso de la vivienda y hacinamiento. Predicho por el primer componente, construido con variables dicotómicas y re categorizadas, utilizando la prueba estadística denominada componentes principales. (34)

1.3 Justificación del estudio

La relevancia de nuestro estudio recae en estudiar la TB, que es la causa infecciosa responsable del mayor número de años perdidos por muerte prematura y años de vida saludable perdidos en el Perú, sobre todo en personas de 15 a 44 años. (36) A nivel mundial y nacional se considera que el tratamiento oportuno del caso índice y control de los contactos cercanos son las mejores estrategias para controlar TB.

Los resultados de nuestro estudio determinan la importancia de realizar rutinariamente pruebas de sensibilidad a los contactos de casos índices antes de iniciar tratamiento específico o antes de iniciar profilaxis con isoniacida, sobre todo en departamentos del Perú con alta prevalencia de TB donde no se cuenta con las facilidades para realizar pruebas de sensibilidad a drogas.

Actualmente, las estrategias de control se focalizan en los resultados del diagnóstico y tratamiento del paciente con TB. Por lo cual, consideramos innovador enfocarnos en un grupo de pacientes que viven y desarrollan TB en un mismo hogar. En este contexto de hogar encontramos factores propios de la concordancia entre cepas del caso índice y de los casos secundarios.

Evaluar aspectos de biología molecular, socioeconómicos y de temporalidad de los casos, podría reforzar en la implementación descentralizada de pruebas de susceptibilidad a nivel nacional para asegurar que las intervenciones del Estado peruano en materia de diagnóstico oportuno y tratamiento completo sean accesibles y gratuitas para los casos secundarios de hogares con un paciente con TB. Los retos socioeconómicos podrían predisponer a una reactivación de TB entre cohabitantes afectados, lo cual debería ser tomado en cuenta por el sistema de salud cuando TB se presenta en miembros de un hogar. Asimismo, existe poca evidencia sobre estudios de cohorte que evalúen el tiempo transcurrido entre un caso índice y un caso secundario dentro de un hogar el cual es importante para determinar el tipo de tratamiento de los casos secundarios y el abordaje preventivo de contactos.

Determinar los factores de riesgo para la discordancia de cepas de TB entre dos miembros de un mismo hogar, brindaría la posibilidad de identificar variables predictoras de transmisión como hacinamiento, cantidad de bacilos por campo, socioeconómicas y genéticas con la finalidad de generar evidencia preliminar de posibles cambios en el ADN del bacilo durante la transmisión dentro del hogar, infecciones mixtas o una posible reactivación. Estas variables pueden ser utilizadas para crear herramientas que apoyen en el control de la TB.

Desde el punto de vista de trascendencia del estudio, la investigación permitió identificar cepas prevalentes en Ventanilla, demostrar que no necesariamente todos los casos secundarios son consecuencia de una transmisión del caso índice, demostrar la importancia del tiempo en la captación de casos secundarios, identificar los factores asociados a la discordancia de cepas en el hogar.

El estudio se desarrolló contando con el apoyo del investigador principal del proyecto original “Determinantes de la susceptibilidad a la Tuberculosis”, y a la ONG “IFHAD” (Innovación para la salud y el desarrollo). Ellos nos autorizaron a utilizar su base de datos y a publicar los resultados de este trabajo de

investigación. Las técnicas moleculares utilizadas son de bajo costo y fácilmente reproducibles. La TB sigue siendo una enfermedad frecuente a nivel nacional.

Relevancia para las políticas públicas. –Nuestros resultados sobre discordancia pueden ser utilizados como evidencia para complementar las guías nacionales para el control de la TB en a) Diagnóstico oportuno, específicamente, la necesidad imperante de contar con pruebas de susceptibilidad a drogas sin discriminación por acceso geográfico o tipo de aseguramiento. El Estado Peruano debería asegurar el acceso universal a pruebas de susceptibilidad mediante la implementación de equipamiento que se ha demostrado ser altamente costo efectivo y son usados en países africanos. b) tratamiento adecuado, brindar tratamiento de acuerdo a la susceptibilidad de la cepa y no empírico basado en aspectos epidemiológicos o suposiciones clínicas. Todo paciente con cultivo positivo de TB debería antes de recibir tratamiento tener una prueba de susceptibilidad. Adicionalmente, el control de los contactos intradomiciliarios debe tener un enfoque familiar y evaluar variables que afectan al grupo humano que cohabita en un hogar.

II.- OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar la discordancia entre las cepas del caso índice de Tuberculosis y los casos secundarios dentro del hogar.

2.2 Objetivos específicos

-Determinar y comparar mediante la técnica de espigotipificación las cepas del caso secundario y del caso índice de enfermedad Tuberculosa dentro del hogar.

-Determinar y comparar la susceptibilidad a drogas específicas de las cepas del caso secundario y del caso índice de enfermedad Tuberculosa dentro del hogar.

-Determinar si el intervalo de tiempo en el que aparece el caso secundario en el hogar se relaciona con la concordancia entre las cepas del caso índice de TB y los casos secundarios dentro del hogar.

-Determinar si factores socioeconómicos influyen en la discordancia entre las cepas del caso índice de TB y los casos secundarios dentro del hogar.

III.- METODOLOGÍA

3.1. Diseño del estudio

El presente proyecto es un estudio analítico, experimental anidado en una cohorte de una investigación previamente realizada y denominada “Determinantes de la susceptibilidad a la Tuberculosis”. Nuestro estudio se realizó utilizando parte de la base de datos que contenían variables socioeconómicas y de laboratorio, así como cepas de TB del estudio original conservadas por el investigador principal en los laboratorios de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Estudio Madre “Determinantes de la susceptibilidad a la Tuberculosis”,
El estudio madre tuvo un diseño de cohorte realizado en el distrito de Ventanilla desde octubre del 2002 a enero del 2009, con el objetivo de identificar determinantes de la susceptibilidad a la Tuberculosis. Ventanilla, donde se realizó el estudio, durante el tiempo que se desarrolló el proyecto original tenía una población de 277 mil 895 habitantes y una densidad poblacional de 3 mil 779,9 habitantes por Km²

El estudio madre siguió los siguientes procedimientos para la captación de pacientes: 1) Realizó vigilancia presencial diaria de lunes a sábado de todos los pacientes que estaban a punto de iniciar tratamiento anti tuberculoso en los 16 establecimientos del Ministerio de Salud (MINSA) de Ventanilla. 2) Solicitó muestras de esputo antes del tratamiento y se realizó cultivos de los mismos en los que se aislaron cepas que fueron conservadas en el laboratorio. 3) Definió como cohabitantes a aquellos contactos intradomiciliarios que pasaban al menos dos horas tres veces a la semana en el mismo hogar. 4) Aplicó un cuestionario con dimensiones socioeconómicas, clínicas y psicológicas a los pacientes, a los cohabitantes y al jefe del hogar. 5) Todos los cohabitantes del hogar de cada paciente con TB fueron censados y se le solicitó una muestra de esputo a los contactos sintomáticos respiratorios.

El seguimiento de los casos de TB se realizaba de forma mensual y si se encontraban sintomáticos respiratorios se solicitaba una muestra y se aplicaba nuevamente un cuestionario enfocado en factores de transmisión. El nivel de pérdida del seguimiento de la base fue del 20% a los 7 años. Adicionalmente se visitaba dos veces al año los hogares de los pacientes con TB con la finalidad de repetir cuestionarios socioeconómicos e indagar sobre casos secundarios de TB en el hogar que el estudio no hubiera captado para llevar un registro a pesar de que no se dispongan de muestras. El estudio madre se llevó a cabo con aprobación del comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Diseño de nuestro estudio

A partir de la base de datos, para nuestro estudio se definieron como casos de TB a todos los pacientes diagnosticados con TB por medio de cultivo positivo por el estudio original. Al primer caso de TB detectado en un hogar desde el inicio del estudio se le denominó caso índice y al cohabitante (líneas arriba la definición del proyecto original para cohabitante) que desarrolló TB y se confirmó por cultivo hasta el final del estudio se le denominó caso secundario. Los casos índices y los casos secundarios de un mismo hogar fueron reconocidos gracias al censo del estudio original.

Procedimientos de laboratorio del estudio original

Todos los procedimientos de laboratorio fueron realizados por un personal que no conocía los datos epidemiológicos ni los datos personales de los participantes del estudio. Para la baciloscopia se utilizó la coloración de Ziehl-Neelsen y la lectura se realizó bajo los protocolos estándar. (37) El cultivo se realizó utilizando la técnica modificada de Petroff Ogawa y la técnica Middlebrook 7H de capa delgada. (37, 38) Todas las muestra de esputo tuvieron un test para susceptibilidad a drogas mediante la técnica de cultivo líquido Microscopic-Observation Drug-Susceptibility (MODS) liquid culture technique. (39, 40) Cuando no fue posible utilizar MODS se utilizó la técnica Tetrazolium Microplate Assay (TEMA).(38)

Se definió como tuberculosis multidrogo-resistente (MDR)-TB a aquella con resistencia a rifampicina e isoniacida.

Procedimientos de laboratorio para el presente estudio

Las muestras fueron descontaminadas por el método NaOH-NALC y cultivadas en medios Middlebrook 7H9. Los cultivos positivos fueron cosechados en placas Petri conteniendo medio 7H11 agar e incubados a 37°C por 2 semanas para obtener mayor cantidad de bacterias. El método de extracción para ADN de los cultivos fue por Lisozima Fenol-cloroformo y el DNA fue re-suspendido en 0.1ml buffer TE. Luego estas muestras fueron procesadas por un método denominado en inglés “Spoligotyping” utilizando el mismo protocolo utilizado por Kamerbeek en 1997 (20).

Resumidamente precisaremos que el método de Kamerbeek se basa en la amplificación del locus DR (Direct Repeats) el cual es altamente polimórfico y posee repeticiones directas de 36 pares de bases (pb) bien conservadas las cuales están separadas por secuencias no repetitivas de 34 a 41 pb de longitud llamados espaciadores; existen 94 espaciadores, pero solo 43 son utilizados para genotipificación por “spoligotyping”.

Se tomaron 5 colonias del cultivo para la extracción del ADN y la confirmación del bacilo tuberculoso se realizó mediante PCR. Los cebadores usados para ampliar las secuencias espaciadoras DR fueron, DRa (GGTTTTGGGTCT GACGAC-5' biotinilado) y DRb (CCGAGAGGGGACGG AAAC). El producto amplificado fue expuesto a partidores específicos para la región DR, específicamente a 43 oligonucleótidos presentes en la membrana (Biodyne tipo C) y los híbridos fueron revelados por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL (enhanced chemiluminescence detection kit; Amersham, Little Chalfont, England) y autorradiografía (Hyperfilm ECL; Amersham). Se utilizaron como controles positivos las cepas *M.tuberculosis* H37rv y *M. bovis*-BCG y un control negativo (agua destilada) presentes en el kit del fabricante.

La región DR fue amplificada y marcada en el PCR, posteriormente la hibridación contra 43 oligonucleótidos específicos unidos covalentemente a una membrana de nitrocelulosa mostró un patrón de barras correspondiente a los espaciadores presentes en la muestra.

Para identificar espoligotipos conocidos, la presencia o ausencia de cada una de las 43 bandas se registró en código binario (base 2), donde 0 significa ausencia de la banda y 1 significa presencia de la banda, generando así 43 dígitos, los cuales fueron divididos en 14 grupos de 3 dígitos más un grupo de un dígito. Luego cada grupo fue convertido a octales (base 8), los cuales fueron comparados con patrones de referencia.(7) El número e identificación de estas barras nos brindó un patrón que permitió identificar el polimorfismo de la cepa. Los patrones de espoligotipos fueron analizados utilizando bases internacionales y corroboradas manualmente por dos observadores independientes y especializados en lectura de espoligotipos. En el Anexo 1 se detalla el protocolo resumido y traducido que se utilizó para el procedimiento de laboratorio.

Adicionalmente al estudio de espoligotipos, para evaluar la concordancia entre las cepas del caso índice y del caso secundario, se utilizaron datos sobre susceptibilidad a drogas antituberculosas es decir a rifampicina e isoniacida.

Factores socioeconómicos

El cuestionario exploró 21 preguntas que fueron clasificadas en cuatro dominios para el posterior análisis: posesión de bienes (televisión, radio, teléfono, refrigerador); acceso a servicios básicos (agua potable, desagüe y electricidad pública); educación (del entrevistado y del jefe del hogar); e ingreso monetario (ingreso del hogar per cápita, deuda familiar y números de días en que la persona durmió con hambre porque no tenía dinero para comprar alimentos “hambruna”).

Creación del puntaje socioeconómico

El puntaje socioeconómico se creó utilizando el análisis de componentes principales siguiendo la metodología del INEI (41). Previo a la construcción del modelo, algunas variables nominales fueron categorizadas para ser introducidas en el análisis (Tabla 01). A mayor puntaje, mayor pobreza y se divide por la mediana en dos grupos:

grupo uno (por debajo de la mediana) y grupo dos (igual o superior a la mediana)

Tabla 1: Recategorización ad hoc de variables nominales socioeconómicas

VARIABLES Socioeconómicas	Pobre = 1	Menos pobre = 0
Principal material de construcción del piso de la vivienda:	a)tierra, arena, ripio.	a)parquet, láminas asfálticas, losetas, similares b)Cemento. d)Madera, otro.
Principal fuente de Agua en la vivienda:	a)red pública fuera de la vivienda b)pilón, c)pozo, d)camión tanque, aguatero. e)Otro	a)red pública dentro de la vivienda
Principal servicio higiénico de la vivienda:	a)pozo ciego séptico, pozo ciego negro, silo. b)letrina c) Red pública fuera de la vivienda d)No tiene servicio higiénico e)Otro	a)red pública dentro de la vivienda.
Principal fuente de alumbrado en la vivienda:	a) Otro	a)electricidad
Hacinamiento	a)si (mayor de 3 personas por cuarto)	a)no (menor o igual a 3 personas por habitación)

Se utilizó el comando de STATA PCA (principal components)

pca x1 x2 x3 x4 x5, component (1)

Donde :

x1= sin servicio de agua potable pública

x2= sin servicio de desagüe público o servicio de agua potable pública

x3= electricidad de red pública

x4= piso de la vivienda

x5= hacinamiento

La variable Pared de la vivienda sólo de esteras, se utilizó como proxy indirecta de ventilación.

3.2. Población y muestra

Se trabajó con los datos epidemiológicos y de laboratorio de todos los hogares en los cuales se encontró un caso índice y un caso secundario de TB en un periodo de siete años. Se procesaron las muestras de todos los hogares en donde se obtuvieron muestras de esputo viables para cultivo del caso índice y del caso secundario.

Criterios de inclusión

- Cepas aceptables para cultivo
- Cepas aceptables de un caso índice que tuviera un caso secundario en el hogar
- Cultivos viables para PCR

Criterios de exclusión

- Cultivos no viables para PCR
- Cepas menores a 1 centímetro cúbico
- Cepas que no tuvieran datos socioeconómicos del hogar

3.3 Operacionalización de variables

Operacionalización de las variables utilizadas para nuestro estudio denominado Discordancia entre las cepas del caso índice de Tuberculosis y los casos secundarios dentro del hogar. Ventanilla – Callao

Variables	Definición operacional	Indicador	Índice
Discordancia entre las cepas del caso índice de Tuberculosis y los casos secundarios dentro del hogar.	Se denominó discordancia cuando al menos una de las técnicas utilizadas (espoligotificación o susceptibilidad a drogas) eran diferentes entre el caso el caso índice y caso secundario.	-Tipo de Espoligotipos de (Haarlem3, Beijing, X3-variant1, T1 u otros) -Susceptibilidad del <i>Mycobacterium tuberculosis</i> a isoniacida y rifampicina (Sensible, resistente a isoniacida, Resistente a rifampicina, o MDR- TB)	Concordante vs. Discordante
Intervalo de tiempo	Intervalo de tiempo transcurrido desde el diagnóstico del caso índice hasta el diagnóstico del caso secundario dentro del hogar.	Número de días	días

Socio - económicos Puntaje de pobreza	El puntaje de pobreza se obtiene mediante el análisis de servicio de agua potable pública, servicio de desagüe público, electricidad de red pública, piso de la vivienda y hacinamiento.	Puntaje en números continuos (a mayor puntaje, mayor pobreza)	grupo uno (por debajo de la mediana) grupo dos (igual o superior a la mediana)
Baciloscopía del caso índice y del contacto	Mediante la técnica de Ziehl-Neelsen y la lectura bajo los protocolos estándar se determina la carga del bacilo.	Carga baciloscópica en número de cruces.	Negativo, Una cruz, Dos cruces y Tres cruces
Sexo del caso índice y del contacto	Determinación biológica del sexo	Tipo de sexo	Hombre, Mujer
Edad del caso índice y del contacto	Edad cronológica	Número de años	Grupo de edad

3.4. Procedimientos y técnicas

Se creó una base de datos exportando del programa Microsoft Excel las variables de interés para el presente análisis y se unió la misma los resultados del análisis de espoligotipos.

3.5 Consideraciones éticas

El proyecto “Discordancia entre las cepas del caso índice de Tuberculosis y los casos secundarios dentro del hogar. Ventanilla – Callao”, código SIDISI: 000006475 recibió aprobación ética en el año 2002. Los datos epidemiológicos fueron extraídos de la base de datos del estudio original, y no incluyeron nombres u otros datos que identifiquen al paciente. Los datos están codificados y sólo se podrá reconocer si los casos provienen de un mismo hogar, asegurando el anonimato de los datos recolectados. Se trabajó con muestras de esputo de pacientes que firmaron un consentimiento informado el cual incluía identificación de M. tuberculosis en esputo para el estudio original denominado “Determinantes de la Susceptibilidad a la Tuberculosis” (aprobado por el comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, código SIDISI 02065). El presente estudio se basó en análisis de datos y muestras previamente recolectadas. No hubo interacción. No se violaron los principios éticos de no maleficencia, justicia, beneficencia o autonomía.

3.6 Análisis

Los resultados de espoligotipos fueron doblemente digitados y revisados. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico STATA V12. Las variables categóricas se presentan en frecuencias, porcentajes y comparadas utilizando la prueba exacta de Fisher.

La edad y el puntaje de pobreza descrita mediante mediana y rangos intercuartílicos fueron comparados utilizando pruebas no paramétricas de wilcoxon signed rank. El tiempo fue analizado inicialmente como variable cuantitativa discreta en días, al ser 7 años de estudio y la mayor incidencia de

casos secundarios en el primer año se decidió categorizar al tiempo en dos intervalos menor de seis meses y mayor de seis meses utilizando el punto de corte utilizado en un estudio referencial con diseño similar al nuestro.(4)

Las cinco variables socioeconómicas (sin servicio de agua potable pública, sin servicio de desagüe público o servicio de agua potable pública, sin electricidad de red pública, con piso de la vivienda de tierra y hacinamiento) se incluyeron en el análisis de componentes principales. Se utilizó el primer componente del análisis para predecir el puntaje de pobreza del hogar (19, 32, 33). Se realizó la recategorización de las variables socioeconómicas categóricas para hacer posible la creación del índice socioeconómico utilizando componentes principales. (41)

Por ejemplo: La variable “Material de construcción del piso del hogar” se recategorizó en 1 si el material de construcción del piso era de tierra, arena o ripio y en 0, si el material de construcción que predominaba en los pisos fueron cemento, madera, parquet, láminas asfálticas, losetas o similares. El puntaje socioeconómico creado a partir del análisis de componentes principales se dividió en dos grupos según la mediana.

El análisis para determinar diferencia en los datos de la población en general (no pareados) se realizó con el test de proporciones o prueba Z. Para el análisis pareado, se utilizó el modelo generalizado lineal (GLM) para la familia binaria. El análisis general se dividió en dos pasos: Análisis univariado y multivariado.

El primer paso fue un análisis univariado para seleccionar las variables predictoras para el modelo multivariado según la fuerza de asociación de cada predictor. Se determinó la significancia, el intervalo de confianza y la razón de prevalencia utilizándose como variable dependiente binaria la discordancia entre las cepas del caso índice y del caso secundario. Se denominó discordancia cuando al menos una de las técnicas utilizadas (espoligotipificación o susceptibilidad a drogas) eran diferentes entre el caso el caso índice y caso secundario. Todo el análisis fue

ajustado por hogar utilizando el comando “cluster” (cl), puesto que se encontró más de un caso secundario en el mismo hogar.

El segundo paso fue un modelo multivariado en el cual se incluyó variables que al análisis univariado tuvieron un $p < 0.2$ o por aproximación teórica. Los datos crudos del tiempo entre el diagnóstico del caso índice y del caso secundario sin categorizar con la finalidad de evaluar posibles diferencias en los resultados obtenidos. Ambos análisis adicionales se presentan en el Anexo 3 : Análisis secundarios. A pesar de tener los datos de tiempo y casos de TB concordante, no se pudo realizar un análisis de tiempo –evento debido a las limitaciones de nuestro diseño. Sin embargo, se realizó un sub análisis incluyendo la variable año en el cual el caso secundario desarrollo TB.

IV.- RESULTADOS

El estudio analizó los datos de 1907 casos índice y 8704 contactos intradomiciliarios. Del total de contactos, 1466 declinaron de participar o se perdieron durante el seguimiento, 6189 fueron asintomáticos, 948 tuvieron cultivos negativos y 101 contactos fueron considerados casos secundarios confirmados por cultivo.

Debido a que en algunos hogares se encontró más de un caso secundario de TB se analizaron 101 muestras de casos secundarios y 87 muestras de casos índices fueron cultivadas, creciendo cepas sólo en 90 muestras de casos secundarios las cuales fueron utilizadas para PCR y espoligotipificación. Estas 90 cepas disponibles corresponden a 81 casos índices.

Características sociodemográficas y de laboratorio de la población de estudio

Las características demográficas de la población de estudio se indican en la Tabla 2. Debido a la distribución de la edad, se presenta la Mediana y el rango intercuartílico. Los datos de grado de instrucción son de la población de estudio independientemente del sexo.

Tabla 2: Características demográficas de la población de estudio

Características demográficas	Caso índice N=81	Caso secundario N=90
Edad, Mediana (RIC)*	25 (19-34)	24 (17-35)
Sexo, n (%)		
Femenino	26 (32)	47 (52)
Masculino	55 (68)	43 (48)
Grado de instrucción, n (%)		
Primaria	12 (15)	+
Secundaria incompleta	33 (41)	
Secundaria completa	26 (33)	

Superior incompleta	6 (8)	
Superior completa	3 (4)	

*RIC: Rango Intercuartílico + No se obtuvo el dato de grado de instrucción del caso secundario.

La edad media del caso índice y del caso secundario no difiere significativamente entre casos índice y casos secundarios ($p= 0.427$, Gráfico 1) La proporción de varones en los casos índice (69%) es significativamente mayor a la encontrada en los casos secundarios (48%, $p =0.008$). Sobre el grado de instrucción del caso índice no se identificó ningún Analfabeto, siendo el grupo predominante el que completó secundaria técnica.

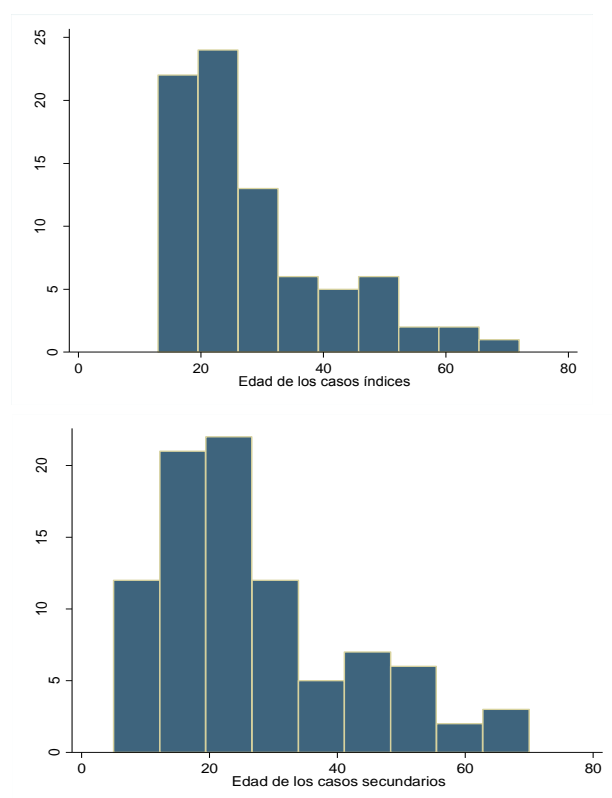


Gráfico 1: Distribución de la edad del caso índice y del caso secundario

En las 81 cepas identificadas de los casos índices se identificó 33 espigotipos únicos, siendo el más frecuente Haarlem3 (11%) (**¡Error! La autoreferencia al marcador no es válida.**). Los 90 casos secundarios de TB fueron causados por 36

espoligotipos únicos, siendo nuevamente el más común Haarlem3 (14%). Un 49% de los espoligotipos hallados en los casos índices y un 42% de los espoligotipos hallados en los casos secundarios no fueron identificados.

Comparando la distribución de los espoligotipos en los hogares, no se encontró diferencias significativas ($p=0.181$)

Tabla 3: Características de laboratorio del caso índice y del caso secundario

Características de laboratorio	Caso índice n= 81 (%)	Caso secundario n=90 (%)
Espoligotipos		
Beijing	7 (9)	6 (7)
Haarlem1	1 (1)	3 (3)
Haarlem3	9 (11)	13 (15)
LAM3	6 (7)	5 (6)
LAM5	2 (2)	1 (1)
LAM9	2 (3)	3 (3)
T1	4 (5)	10 (11)
X1	3 (4)	3 (3)
X3-Variant1	7 (9)	5 (6)
X3-Variant2	0 (0)	1 (1)
H37Rv	0 (0)	2 (2)
No identificado	40 (49)	38 (42)
Baciloscopia en cruces		
0 (Negativo)	9 (11)	42 (47)
1 (10 a 99 BAAR en 100 campos)	33 (41)	22 (24)
2 (1 a 10 BAAR por campo en un mínimo de 50 campos)	14 (17)	12 (13)
3 (> 10 BAAR por campo en un mínimo de 20 campos)	25 (31)	14 (16)
Susceptibilidad a drogas		
Sensible	36 (44)	24 (27)
Resistente a Isoniacida	20 (25)	27 (30)
Resistente a Rifampicina	13 (16)	21 (23)
Resistente a Isoniacia y Rifampicina (MDR)	12 (15)	18 (20)

La baciloscopia demuestra que un 11% de los casos índices tienen resultados negativos y un 31% tienen baciloscopia tres cruces. En contraste los casos secundarios tienen un mayor número de baciloscopias negativas (47%), siendo esta diferencia significativa ($p=0.008$). El resultado de las pruebas de sensibilidad a drogas nos presenta a los casos índices con un 44% de sensibilidad a drogas anti TB, mientras que el porcentaje sensibilidad a drogas anti TB de los casos secundarios fue de 27% ($p=0.017$), con un importante 30% de resistencia a la Isoniacida. El porcentaje de cepas MDR del grupo de casos secundarios fue 5% mayor que el el grupo de cepas de casos índices: 20% contra 15%. La diferencia en el porcentaje de MDR entre el caso índice y el caso secundario no fue estadísticamente significativa ($p=0.373$).

El 88% (71/81) de los hogares se encontraban en pobreza extrema tomando como referencia el gasto total per cápita para cubrir la canasta básica. En la Tabla 4 se detallan las demás características del hogar estudiadas.

Tabla 4: Características socioeconómicas del hogar

Características socioeconómicas del hogar (n=81)	
Gasto familiar semanal en alimentación en soles, Mediana (RIC)	105 (70 - 140)
Ingreso mensual de la vivienda en soles, Mediana (RIC)	560 (400 - 840)
Número de personas que normalmente duermen en casa, Mediana (RIC)	6 (4 - 7)
Número de dormitorios que hay en el hogar, Mediana (RIC)	3 (2 - 4)
Endeudamiento de la familia, n (%)	
Familias reportaron no tener deuda	53 (66)
Familias que reportaron tener deudas	27 (44)
Número de días en un mes en los que se han acostado con bastante hambre porque no había comida en casa, n (%)	
0	67 (84)
1	1 (1)
2	2 (3)
>2	10 (12)

Propiedad de vivienda, n (%)	
a. Propia	65 (81)
b. Alquilada	1 (1)
c. Prestada	3 (4)
d. Hipotecada	1 (1)
e. Otro (invasión, cuidador temporal, alojados por familiar.)	10 (13)
Grado de estudio del jefe/la jefa del hogar, n (%)	
a. Analfabeto	0 (0)
b. Primaria	16 (26)
c. Secundaria o técnica incompleta	22 (36)
d. Secundaria o técnica completa	16 (26)
e. Superior incompleta	3 (5)
f. Superior completa	4 (7)
Material que predomina en las paredes exteriores de la vivienda, n (%)	
a. Ladrillo, cemento	40 (50)
b. Adobe	0 (0)
c. Quincha (caña con barro)	0 (0)
d. Piedra con barro	1 (1)
e. Madera	27 (34)
f. Estera	5 (6)
g. Otro:	7 (9)
Material que predomina en los pisos de la vivienda, n (%)	
a. Parquet, madera pulida	1 (1)
b. Láminas asfálticas, vinílicos, similar	1 (1)
c. Losetas, terrazos, similares	2 (3)
d. Madera, entablado	0 (0)
e. Cemento	46 (58)
f. Tierra, arena, ripio	26 (32)
g. Otro:	4 (5)

Fuente de abastecimiento de agua del hogar, n (%)	
a. Red pública dentro de vivienda	45 (56)
b. Red pública fuera de vivienda	1 (1)
c. Pilón	8 (10)
d. Pozo	2 (3)
e. Río, acequia, puquio	23 (29)
f. Camión tanque, aguatero	0 (0)
g. Agua entubada no potable	1 (1)
Tipo de servicio higiénico, n (%)	
a. A red pública dentro de vivienda	40 (50)
b. A red pública fuera de vivienda	1 (1)
c. Letrina	3 (4)
d. Pozo ciego séptico, pozo ciego negro, silo	34 (43)
e. Sobre acequia, canal	0 (0)
f. No tiene servicio higiénico	2 (2)
Tipo de alumbrado del hogar, n (%)	
a. Electricidad	73 (91)
b. Kerosene, petróleo, gas	0 (0)
c. Vela	5 (7)
d. Ninguno	1 (1)
e. Otro:	1 (1)
Tipo de combustible que la familia usa para cocinar, n (%)	
a. Kerosene, petróleo, gas	72 (90)
b. Carbón	5 (6)
c. Leña	2 (3)
d. No cocina	1 (1)
Si tiene en casa televisor que funcione, n (%)	69 (86)
Si tienen en casa radio que funcione, n (%)	62 (77)
Si tienen en casa teléfono que funcione, n (%)	31 (39)
Si tienen en casa cocina que funcione, n (%)	75 (94)
Si tienen en casa refrigeradora que funcione, n (%)	37 (46)

*RIC: Rango Intercuartílico,

Puntaje socioeconómico de la población de estudio

Cómo se mencionó en los métodos, la creación del puntaje socioeconómico considera sólo algunas variables socioeconómicas, previamente validadas por el INEI.

La Tabla 5 muestra el valor de los “Eigenvectors” o vectores propios de las variables utilizadas en el modelo final del análisis de componentes principales para crear el puntaje del nivel socioeconómico

Tabla 5: Valores de los vectores propios de las variables socioeconómicas del modelo final.

VARIABLES INCLUIDAS EN EL MODELO FINAL	VALORES DE LOS “VECTORES PROPIOS” (“EIGENVECTORS”)*
Pisos de tierra en la vivienda	0.39
Sin servicio de agua potable de red pública	0.51
Sin servicio de desagüe de red pública	0.52
Alumbrado eléctrico de red pública	0.44
Hacinamiento	0.33

* La proporción de varianza explicada por el primer componente fue del 59%.

Determinación y comparación de las cepas del caso secundario y del caso índice de enfermedad Tuberculosa dentro del hogar mediante la técnica de espoligotipificación

Se seleccionó sobre la base de cultivos positivos en el caso índice y también en los casos secundarios. Se obtuvo 91% de crecimiento en cultivo (171/188 muestras). Los espoligotipos difieren entre el caso índice y el caso secundario en un 31% de los casos mientras que los demás comparten la misma cepa. Además 5 de los 28 casos con espoligotipos difieren sólo en una banda del oligonucleótido y si lo reclasificaríamos como concordante el número de casos secundarios con diferente

espoligotipo caería al 26% (23/90). La lista de espoligotipos corridos se presenta en el Anexo 02.

Discordancia en espoligotipos

Según el análisis univariado los espoligotipos discordantes se asocian al tiempo transcurrido entre el diagnóstico del caso índice y el diagnóstico del caso secundario, a menor tiempo transcurrido el riesgo de que sea un espoligotipo discordante es mayor. La mediana de tiempo desde el diagnóstico del caso índice hasta el caso secundario fue de 44 días (RIC 10 -129) si los espoligotipos eran diferentes y de 336 días (RIC: 131 – 663) si los espoligotipos eran comunes ($p=0.001$). Otras características que fueron analizadas se detallan en la Tabla 6 : Análisis univariado entre las características de los casos y la discordancia de espoligotipos entre el caso índice y el caso secundario..

Tabla 6 : Análisis univariado entre las características de los casos y la discordancia de espoligotipos entre el caso índice y el caso secundario.

Características de los casos	Razón de prevalencia	Intervalo de confianza (95%)	Valor de p**
Tiempo transcurrido entre el diagnóstico del caso índice y el diagnóstico del caso secundario es menor a 6 meses.	5.74	(2.10 – 15.69)	0.001
Edad del caso índice	0.99	(0.98 – 1.02)	0.923
Sexo del caso índice: Masculino	0.95	(0.49 – 1.86)	0.889
Edad del caso secundario	1.01	(0.98 – 1.03)	0.608
Sexo del caso secundario: Masculino	0.61	(0.32 – 1.14)	0.119
Puntaje socioeconómico: grupo 2 ⁺	1.15	(0.60 – 2.20)	0.665
Ventilación: Pared de la vivienda sólo de esteras	2.23	(1.26 – 3.95)	0.006
Baciloscopia negativa del caso índice	1.74	(0.89 – 3.40)	0.106
Caso índice multidrogo resistente	0.50	(0.13 – 1.86)	0.302
Caso secundario multidrogo resistente	2.22	(1.25 – 3.95)	0.006

*Prevalencia de cepas discordantes en expuestos entre prevalencia de cepas discordantes en no expuestos

**Prueba de GLM para datos binarios ajustado por hogar

+ Grupo 2: Se refiere al grupo igual o superior a la mediana del índice de pobreza (a mayor puntaje mayor pobreza)

El análisis univariado demuestra que el tiempo transcurrido entre el diagnóstico del caso índice y el diagnóstico del caso secundario menor a 6 meses ($p=0.001$), paredes de la vivienda a predominio de esteras ($p=0.006$) y casos secundarios multidrogo resistente ($p=0.006$) estuvieron asociados a la discordancia de espoligotipos.

Tabla 7: Análisis multivariado entre las características de los casos y la discordancia de espoligotipos entre el caso índice y el caso secundario.

Características de los casos	Razón de prevalencia	Intervalo de confianza (95%)	Valor de p*
Tiempo transcurrido entre el diagnóstico del caso índice y el diagnóstico del caso secundario menor a 6 meses.	5.70	(2.05 – 15.80)	0.001
Baciloscopia negativa del caso índice	1.68	(1.09 – 2.59)	0.018

*Prueba de GLM para datos binarios ajustado por hogar

El análisis multivariado demuestra que el tiempo transcurrido entre el diagnóstico del caso índice y el diagnóstico del caso secundario y una baciloscopia negativa del caso índice se asocian a la discordancia de espoligotipos.

Susceptibilidad a drogas específicas de las cepas del caso secundario y del caso índice dentro del hogar.

Del total de casos evaluados, el 18% (30/171) fueron casos de TB-MDR. La prevalencia de TB-MDR entre los casos índices y los contactos no estuvo

asociada significativamente ($p=0.4$). El 22% (20/90) de los casos secundarios tuvieron resultados de susceptibilidad a drogas diferente al del caso índice. En la Tabla 8 se detalla el análisis univariado de las características del caso índice, del caso secundario y del hogar en relación a las diferencias de las cepas en su susceptibilidad a drogas.

Tabla 8: Análisis univariado entre características de los casos y la discordancia de susceptibilidad a drogas específicas.

Características de los casos	Razón de prevalencia	Intervalo de confianza (95%)	Valor de p^*
Tiempo transcurrido entre el diagnóstico del caso índice y el diagnóstico del caso secundario menor a 6 meses.	1.43	(0.62 – 3.32)	0.399
Edad del caso índice	1.00	(0.97 – 1.03)	0.977
Sexo del caso índice : Masculino	0.84	(0.35 – 1.99)	0.689
Edad del caso secundario	0.96	(0.92 – 1.01)	0.145
Sexo del caso secundario: Masculino	0.73	(0.34 – 1.55)	0.409
Puntaje socioeconómico: grupo 2 ⁺	3.00	(1.16 – 7.79)	0.024
Pared de la vivienda sólo de esteras	3.42	(1.78 – 6.55)	<0.001
Baciloscopia negativa del caso índice	1.41	(0.47 – 4.23)	0.539

*Prueba de GLM para datos binarios ajustado por hogar

⁺ Grupo 2: Se refiere al grupo igual o superior a la mediana del índice de pobreza (a mayor puntaje mayor pobreza)

El análisis multivariado demostró que los hogares viviendo en el grupo dos del puntaje de pobreza, es decir, los de mayor puntaje (RP[IC95%]: 3.00 [1.16-7.79], $p= 0.024$), se relacionan significativamente a un caso secundario con un resultado de susceptibilidad diferente al del caso índice.

Discordancia entre las cepas del caso índice de Tuberculosis y los casos secundarios dentro del hogar

La concordancia global comparando las cepas obtenidas de la espoligotipificación y los resultados de las pruebas de susceptibilidad del caso índice versus el caso secundario, nos demuestra que el 38% (34/90) son discordantes.

En la

Tabla 9 se detalla el análisis univariado de las características de los casos y su asociación con la discordancia de cepas.

Tabla 9: Análisis univariado de las características de los casos y la discordancia de cepas (espoligotipificación y pruebas de susceptibilidad).

Características de los casos	Razón de prevalencia	Intervalo de confianza (95%)	Valor de p*
Tiempo transcurrido entre el diagnóstico del caso índice y el diagnóstico del caso secundario menor a 6 meses.	2.66	(1.37 – 5.16)	0.004
Edad del caso índice	1.00	(0.99 – 1.02)	0.699
Sexo del caso índice : Masculino	0.83	(0.47 – 1.45)	0.508
Edad del caso secundario	1.00	(0.98 – 1.02)	0.748
Sexo del caso secundario: Masculino	0.68	(0.40 – 1.16)	0.153
Puntaje socioeconómico: grupo 2	1.27	(0.73 – 2.21)	0.404
Pared de la vivienda sólo de esteras	1.77	(1.03 – 3.04)	0.040
Baciloscopia negativa del caso índice	1.71	(0.98 – 2.99)	0.058

*Prueba de GLM para datos binarios ajustado por hogar

Cuando realizamos el análisis de la discordancia entre cepas utilizando tanto la espoligotipificación y la susceptibilidad a drogas, el factor socioeconómico pierde su significancia en el análisis multivariado de $p= 0.024$ a $p=0.404$

En el análisis multivariado la discordancia de cepas se asoció independientemente a una diferencia de menos de 6 meses entre el diagnóstico del caso índice y del caso secundario (RR [IC95%]: 2.62 [1.34-5.13], $p=0.005$) y baciloscopia negativa del caso índice (1.63[1.08-2.45], $p=0.019$)

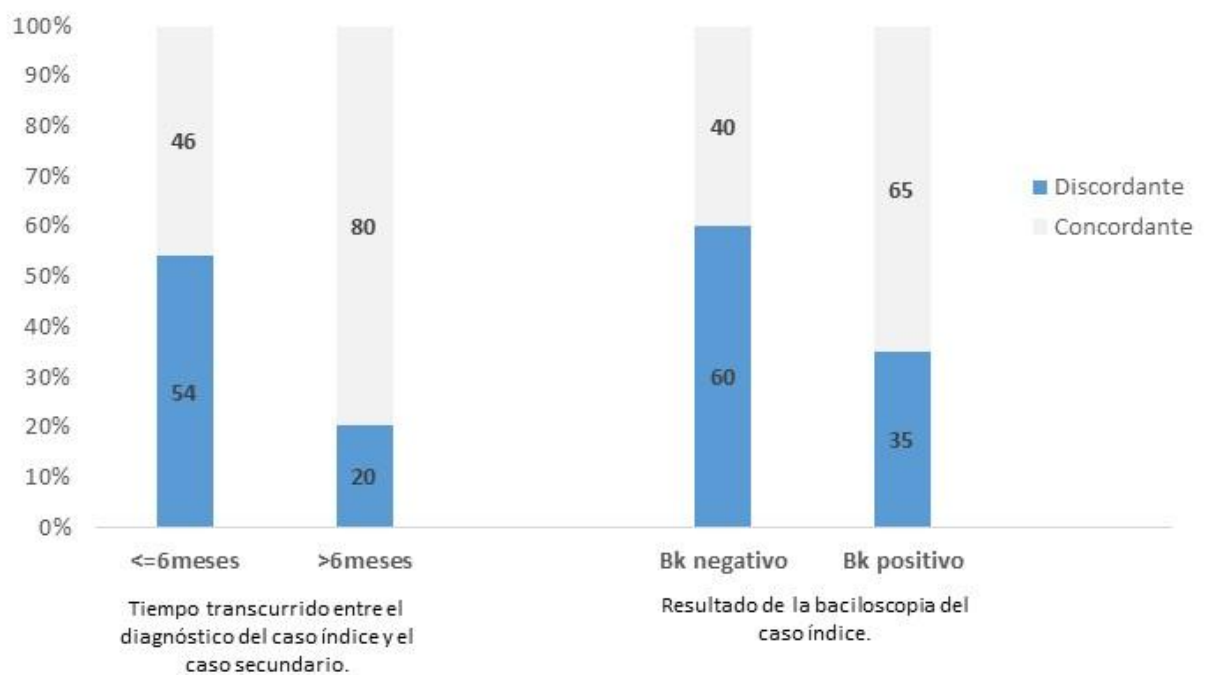


Gráfico 2: Factores asociados a la discordancia de cepas entre el caso índice y caso secundario en el hogar.

V.- DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta tesis fue evaluar la discordancia entre cepas de TB del caso índice y caso secundario en el contexto del hogar y los factores asociados. A partir del análisis univariado, se evidencia que la discordancia entre cepas del hogar es alta (38%) y se evidenció tanto con la prueba de espigotipificación como con la comparación de los resultados de susceptibilidad a isoniacida y rifampicina. La prevalencia de TB en los casos secundarios fue consistente con lo encontrado en la literatura y fue aproximadamente igual al 1% (42). Nuestros resultados coinciden con otros estudios que reportan una discordancia del 63% (43), asimismo, se han reportado cepas discordantes en la transmisión de cepas de TB – MDR (24) y durante brotes en áreas con baja prevalencia de TB (44).

En Sudáfrica solo el 18.8% de las cepas del caso índice y el caso secundario compartieron la misma susceptibilidad a drogas (18). En el Perú se ha reportado casos secundarios con diferente susceptibilidad a drogas que el caso índice (45) y que al menos el 4% de pacientes TB-MDR se reinfectaron con una segunda cepa de TB-MDR (12)

Existen algunas explicaciones para las cepas discordantes dentro de un hogar. Es posible que un caso índice este portando más de una cepa de TB, infecciones mixtas, en los cuales se ha encontrado que clonas diferentes se asientan en diferentes lesiones pulmonares en forma independiente y de éstas sólo una haya sido detectada al momento de evaluar la prueba de esputo. (6, 46)

Las infecciones mixtas se presentan en lugares con alta incidencia de TB, como el nuestro, debido a la mayor probabilidad de infectarse una y otra vez. Las infecciones mixtas pueden brindar resultados parciales sobre la resistencia a antimicrobianos específicos, de ahí que debería ser tomado en cuenta sobre todo en pacientes con recaídas. Los reportes sobre la incidencia de estos casos mixtos aun la considerada baja, pero debe tenerse en cuenta ya que no se realizan estudios genéticos de rutina. (6, 46). El diseño de nuestro estudio no nos permitió determinar infecciones mixtas, aunque consideramos que su influencia en nuestros

resultados sería mínima debido al alto porcentaje de casos secundarios con cepas concordantes.

Otro fenómeno que puede explicar la discordancia es la microevolución de la cepa, la cual sugiere que el bacilo tiene la capacidad de variar en su genoma y esta puede producirse durante la enfermedad o en el periodo de latencia. Nuestros resultados detectaron cinco casos de cepas discordantes debido a diferencias en una sola banda del oligonucleótido. Sin embargo, la técnica de espigotipificación no es la más adecuada para asegurar que esa única variante sea consecuencia de una variación del genoma intra paciente. Los estudios sobre variación del genoma resaltan la importancia biológica de la TB latente como punto de partida para comprender las dinámicas de transmisión y variabilidad genómica intra e interpaciente. La microevolución en casos agrupados podría reportar falsos discordantes.(5)

Otra explicación de la discordancia es la posibilidad que la transmisión haya ocurrido fuera del hogar en la comunidad, ya que esta comunidad donde se desarrolló el presente estudio tiene alta prevalencia de TB (9), pero no podría explicar porque el caso índice y el caso secundario desarrollan TB en un tiempo relativamente corto. Adicionalmente el riesgo anual de infección en Ventanilla es sólo del 2.2% (47). Para determinar con mayor especificidad y sensibilidad si las cepas han sido transmitidas del caso índice al secundario se requeriría realizar análisis más profundos del ADN (5)

Nuestros resultados refuerzan la hipótesis planteada en este estudio en la cual existe una importante proporción de discordancia de cepas entre casos de TB en el hogar a consecuencia de otros aspectos poco estudiados como cambios en el ADN o una posible reactivación de cepas latentes entre los miembros de una familia. No es posible determinar si las cepas discordantes provienen de la comunidad o son de los miembros del hogar, pero si podemos afirmar que este “cluster” de cepas discordantes se presentan más cuando los miembros del hogar son diagnosticados en corto tiempo con baciloscopias con baja carga bacilar y viven en extrema pobreza. El hecho de que el tiempo transcurrido sea corto en cepas discordantes refleja que el caso secundario es producto de una exposición grupal (de todo el

hogar) pero con consecuencias individuales, es decir, cada episodio de TB es independiente.

La presencia de estos factores de riesgo nos indica que posiblemente existe un complejo sistema de riesgo en función del hogar y no un conjunto de sólo riesgos individuales (29). La pobreza es uno de los factores de riesgo mejor conocidos para el desarrollo de TB y recaídas de TB y situaciones catastróficas que incrementen los niveles de pobreza del hogar podrían incrementar la reactivación de TB(48). A nivel mundial la prevalencia de TB se dirige por cambios en los determinantes socioeconómicos en mayor magnitud que por las estrategias de control, fortaleciendo el consenso internacional, el cual refiere que el éxito de DOTS para el control de la TB debe ser fortalecido con intervenciones socioeconómicas. El Perú tiene un programa de control de la TB que ha logrado muchos éxitos, sin embargo la incidencia de TB sensible y TB MDR es aún un problema de salud pública en el país. Aunque el programa nacional tiene una alta identificación de casos de TB, las intervenciones que fortalezcan los retos socioeconómicos aún son escasos. Un estudio realizado en un área pobre de Perú, demostró que las intervenciones socioeconómicas son oportunidades para la sociedad civil, mejoran las actividades de promoción, permiten medir el impacto de incentivos económicos y nutricionales e indirectamente tienen un impacto positivo en la prevención, diagnóstico y tratamiento de la TB. (24, 33)

Los resultados del análisis multivariado refuerza la evidencia generada por estudios que utilizan pruebas moleculares en comunidades con TB prevalente y poco prevalente han demostrado que la mayoría de casos secundarios aparecen cerca en el tiempo al caso índice (49). La discordancia entre cepas se presenta en corto tiempo, en contraste los casos concordantes, los cuales serían el resultado de una transmisión reciente de TB que requieren más tiempo de exposición. Esta afirmación fue planteada por un estudio reciente(50) el cual mediante un modelamiento demuestra que cuando se diagnostica a un caso índice, del 75 al 95% de los contactos intradomiciliarios ya están infectados, pero sólo del 1.5 al 3% tienen suficiente tiempo para desarrollar TB. Sin embargo, la literatura relacionada a la concordancia de cepas y el tiempo entre la infección y el desarrollo de la enfermedad del caso secundario es escasa.

En relación a la baciloscopia, nuestra propuesta de una reactivación es reforzada por la asociación encontrada entre la discordancia y una baciloscopia negativa en el caso índice. En presencia de enfermedad cavitaria se espera que los contactos intradomiciliarios estén más expuestos a una transmisión intradomiciliaria (1). En el caso de una reactivación, la poca densidad de bacilos en una muestra de esputo reflejaría una menor probabilidad de transmisión.

Debido a inadecuados procesos de laboratorio como frotis muy gruesos o muy finos, desprendimientos del frotis, impericia e impaciencia del observador pueden incrementar baciloscopías falso negativos. Se debe tener en cuenta que la sensibilidad disminuye cuando el número de bacilos por mililitro de esputo es menor. A pesar de esta desventaja, consideramos que no tiene implicancias en nuestro estudio debido a que todos los pacientes seleccionados para este estudio fueron cultivo positivo.

Un grupo importante de espoligotipos aislados cuando fueron comparados con bases internacionales no pudieron ser identificados, el fenómeno de micro evolución podría explicar parte de la presencia de éstas cepas huérfanas (5). Las cepas concordantes generalmente se encuentran agrupadas en pacientes VIH seropositivos y en pacientes con baciloscopía positiva, lo que podría extender el periodo de transmisión del patógeno entre el caso índice y los contactos.(51) Al ser nuestro estudio comunitario, en una población con baja prevalencia de VIH, es válida la posibilidad de encontrar espoligotipos no agrupados.

La utilización de sólo “Spoligotyping” puede ser cuestionable debido a su poca capacidad de discriminación entre cepas y podría sobre estimar la transmisión de TB. El nivel de profundidad del estudio del genoma que nos permite la espoligotipificación no permite identificar los casos que están sobreestimando la concordancia. Por lo cual, se recomienda actualmente su uso combinado con otras pruebas moleculares como IS6110-RFLP o MIRU-VNTR para una mejor identificación de las cadenas de transmisión. Sin embargo, la contribución y uso de estas técnicas han sido cuestionadas por estudios basados en el genoma de TB. (52) Consideramos que haber complementado el uso de espoligotipificación con pruebas de susceptibilidad a drogas es suficiente para demostrar la discordancia de cepas que afectan a un caso índice y a un caso secundario de un mismo hogar a

pesar de que se puede desestimar el porcentaje de discordancia, que consideramos puede ser mayor.

Es importante resaltar que reportamos un mayor porcentaje de mujeres en los casos secundarios de TB, cuando en casi todos los países en desarrollo, se reportan más casos de TB en hombres que en mujeres sobre todo después de los 14 años. Sin embargo, factores socioeconómicos y culturales pueden influenciar en el acceso de la población femenina a los servicios de salud, lo que puede conllevar a un subregistro de casos de TB en mujeres.(53) El estudio del cual procedieron los datos utilizados en nuestras estimaciones, realizó una búsqueda activa de casos secundarios, lo que puede haber influenciado en el porcentaje de mujeres. (29)

Aunque nuestros resultados no muestran relación entre cepas sensibles o resistentes y la discordancia, es importante resaltar que tradicionalmente las cepas resistentes han sido consideradas menos patogénicas. Esta afirmación se basa en ensayos que demuestran que estas cepas mutantes pierden la actividad de la enzima catalasa, la cual es una indicadora de una virulencia atenuada. Algunos estudios han comparado la transmisibilidad de cepas sensibles versus resistentes demostrando que la TB que aparece en conglomerados está asociada a transmisión reciente y no a la susceptibilidad de la cepa. (54)

Sin embargo, existe considerable evidencia que no siempre las cepas resistentes son menos patogénicas o transmisibles, siendo capaces de producir altos porcentajes de transmisión a nivel comunitario e intrahospitalario. Principalmente a consecuencia de la duración de la exposición de los contactos con los pacientes con cepas resistentes, la cual tiende a ser mayor cuando no existe disponibilidad de pruebas rápidas de susceptibilidad y mala adherencia al tratamiento. (54) En cuanto a la influencia de las cepas resistentes en la discordancia, al parecer los resultados de la susceptibilidad a drogas no tienden a afectar la discordancia. (13)

La importancia de los hallazgos de este trabajo que indican una alta discordancia entre cepas que circulan en un hogar para la salud pública radica en la agenda pendiente del país en el control de la TB. Con la finalidad de alcanzar los objetivos de reducción de la TB, es necesario mantener la eficiencia y eficacia de las intervenciones y para ello se requiere el acceso prioritario y descentralizado de

las pruebas diagnósticas, extendiéndola a todo el país. Se requiere pruebas diagnósticas más sensibles y rápidas de sensibilidad que permitan que los pacientes con TB reciban tratamiento adecuado y específico. Que permitan eliminar la práctica de brindar tratamiento sin una prueba de sensibilidad previa e incrementar las probabilidades de cepas resistentes en la comunidad.

Asimismo, a nivel hogar es necesario que ante un caso de TB en la familia, se progrese en la atención integral domiciliaria con atención personalizada. Teniendo en cuenta las áreas de alta vulnerabilidad con elevado riesgo de transmisión como nuestro lugar de estudio.

Al diseñar el presente trabajo de investigación se esperaba encontrar discordancia entre cepas, sin embargo no a corto tiempo. Lo cual como se ha detallado en párrafos anteriores se podría explicar por variables antes no consideradas en la norma técnica nacional como son microevolución, infecciones mixtas y reactivación por factores socioeconómicos.

Limitaciones del estudio

El presente trabajo de investigación considera las siguientes limitaciones:

-La prueba molecular de espoligotipificación utilizada en el presente estudio no discrimina completamente las cepas de TB, es decir, las cepas denominadas concordantes pueden ser las más comunes y no necesariamente compartir el mismo material genético entre ellas. Actualmente, existen otras pruebas moleculares que permiten identificar todo el genoma y mejorar la discriminación como MIRU-VNTR (Mycobacterial In-terpersed Repetitive Unit–Variable Number Tandem Repeat) , RFLP (IS6110-restriction fragment length polymorphism) debido al costo y complejidad. Sin embargo, el uso de espoligotipificación ha sido suficiente para demostrar la discordancia de cepas.

-Al ser un estudio que utilizó una base secundaria de datos ya obtenidos, no se pudo medir otras variables de interés, socioeconómico como tipo de trabajo, grupos sociales donde se desarrolla, clínicas como tiempo y frecuencia de tos de

los casos índices y de ventilación como número de ventanas y circulación de aire que la literatura considera importantes.

-No se realizó la medición de VIH en los participantes, sin embargo, se conoce que la presencia de VIH incrementa el riesgo de transmisión de TB en la comunidad, pero en nuestro lugar de estudio la prevalencia de VIH es menor del 0.1%.

-Sobre el análisis estadístico utilizado en esta tesis, potencialmente se podría haber usado un análisis “tiempo hasta que se produce el evento”. Sin embargo, a pesar de tener datos sobre el tiempo transcurrido entre el diagnóstico del caso índice y el caso secundario de TB sólo se tenía información y se incluyó en nuestro estudio a los contactos de pacientes con TB que se volvieron casos secundarios y no al grupo de contactos que no desarrollaron TB en el mismo periodo de tiempo.

VI.- CONCLUSIONES

-Existe discordancia entre cepas del caso índice y del caso secundario a nivel de susceptibilidad de drogas y espoligotipificación.

-La discordancia debe considerarse sobre todo ante periodos cortos entre el diagnóstico del caso índice y secundario y baciloscopía negativa del caso índice.

-En nuestro lugar de estudio la transmisión intradomiciliaria demostrada por la concordancia de cepas sigue siendo la principal manera de infectarse y desarrollar TB.

-Una proporción importante de las cepas aisladas de casos secundarios no están relacionadas a la cepa del caso índice (discordantes), lo que sugiere que no corresponden a transmisión intradomiciliaria.

-Nuestro hallazgo sobre la discordancia de cepas debe ser tomado en cuenta en las guías nacionales, tanto para la prevención y diagnóstico de nuevos casos, como para la selección del tratamiento para los casos secundarios.

-La micro evolución de cepas podría explicar la discordancia de cepas, sin embargo, aunque nuestros resultados arrojan indicios preliminares, estos resultados no pueden ser conclusivos.

-Las variables de tenencia de activos fueron utilizadas para medir el índice de pobreza.

-La TB MDR no estuvo relacionada con la discordancia.

-Casi la mitad de los espoligotipos aislados no pudieron ser identificados en bases internacionales. De las cepas que fueron identificadas, Haarlem3 fue la más prevalente en los hogares de nuestro estudio.

-Los factores socioeconómicos estuvieron asociados a la discordancia de cepas teniendo en cuenta sólo la susceptibilidad a drogas. Sin embargo, no se asoció a la discordancia global que consideraba además las diferencias de espoligotipos.

VII.- RECOMENDACIONES

El resultado de nuestra tesis nos permite realizar las siguientes recomendaciones:

- Todo caso confirmado de TB debe tener acceso a una prueba de susceptibilidad a drogas en las diferentes etapas del tratamiento.
- Formular intervenciones a nivel hogar para el control de la tuberculosis.
- Evaluar en futuros estudios los factores socioeconómicos y su posible influencia en la discordancia de TB en hogares con más de un caso de TB.
- Mencionar en las guías nacionales la discordancia de cepas como una alternativa a la transmisión reciente.
- Realizar estudios complementarios sobre micro evolución de cepas e infecciones mixtas.

VIII. - REFERENCIAS

1. Farga V, Caminero J. Tuberculosis. 3 ed. Santiago de Chile: Editorial Mediterráneo; 2011.
2. Ministerio de Salud. Norma Técnica Peruana de Salud para la atención integral de las personas afectadas por Tuberculosis. Lima; 2013.
3. Dahle UR, Sandven P, Heldal E, Caugant DA. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Norway. *J Clin Microbiol*. 2001 May;39(5):1802-7.
4. Singh J, Sankar MM, Kumar S, Gopinath K, Singh N, Mani K, et al. Incidence and prevalence of tuberculosis among household contacts of pulmonary tuberculosis patients in a peri-urban population of South Delhi, India. *PLoS One*. 2013;8(7):e69730.
5. Navarro Y, Perez-Lago L, Herranz M, Sierra O, Comas I, Sicilia J, et al. In-Depth Characterization and Functional Analysis of Clonal Variants in a *Mycobacterium tuberculosis* Strain Prone to Microevolution. *Front Microbiol*. 2017;8:694.
6. Perez-Lago L, Herranz M, Navarro Y, Ruiz Serrano MJ, Miralles P, Bouza E, et al. Clonal Complexity in *Mycobacterium tuberculosis* Can Hamper Diagnostic Procedures. *J Clin Microbiol*. 2017 May;55(5):1388-95.
7. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guide to the Application of Genotyping to Tuberculosis Prevention and Control. 2016 [updated 2016 5 Diciembre 2016; cited]; Available from: www.cdc.gov/tb/programs/genotyping/chap4/4_combining_1_definitions.htm.
8. Sonnenberg P, Murray J, Glynn JR, Shearer S, Kambashi B, Godfrey-Faussett P. HIV-1 and recurrence, relapse, and reinfection of tuberculosis after cure: a cohort study in South African mineworkers. *Lancet*. 2001 Nov 17;358(9294):1687-93.
9. Brooks-Pollock E, Becerra MC, Goldstein E, Cohen T, Murray MB. Epidemiologic inference from the distribution of tuberculosis cases in households in Lima, Peru. *J Infect Dis*. 2011 Jun 1;203(11):1582-9.

10. Pelly TF, Santillan CF, Gilman RH, Cabrera LZ, Garcia E, Vidal C, et al. Tuberculosis skin testing, anergy and protein malnutrition in Peru. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2005 Sep;9(9):977-84.
11. Sita-Lumsden A, Laphorn G, Swaminathan R, Milburn HJ. Reactivation of tuberculosis and vitamin D deficiency: the contribution of diet and exposure to sunlight. *Thorax.* 2007 Nov;62(11):1003-7.
12. Cohen T, Murray M, Abubakar I, Zhang Z, Sloutsky A, Arteaga F, et al. Multiple introductions of multidrug-resistant tuberculosis into households, Lima, Peru. *Emerg Infect Dis.* 2011 Jun;17(6):969-75.
13. Grandjean L, Gilman RH, Martin L, Soto E, Castro B, Lopez S, et al. Transmission of Multidrug-Resistant and Drug-Susceptible Tuberculosis within Households: A Prospective Cohort Study. *PLoS Med.* 2015 Jun;12(6):e1001843; discussion e.
14. Gori A, Bandera A, Marchetti G, Degli Esposti A, Catozzi L, Nardi GP, et al. Spoligotyping and Mycobacterium tuberculosis. *Emerg Infect Dis.* 2005 Aug;11(8):1242-8.
15. Singh UB, Suresh N, Bhanu NV, Arora J, Pant H, Sinha S, et al. Predominant tuberculosis spoligotypes, Delhi, India. *Emerg Infect Dis.* 2004 Jun;10(6):1138-42.
16. Zevallos K, Alvarado J, Quino W, Fuentes P, Sheen P, Herrera B, et al. Household TB clustering associated with TB reactivation and poverty In: Abstracts of the 40th International Union Against TB & Lung Disease Annual Conference; Mexico;2009 December 3-7; Abstract 3 Centers for Disease Control Late-breaker session; 2009
2009.
17. Commandeur S, van Meijgaarden KE, Lin MY, Franken KL, Friggen AH, Drijfhout JW, et al. Identification of human T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis resuscitation-promoting factors in long-term latently infected individuals. *Clin Vaccine Immunol.* 2011 Apr;18(4):676-83.
18. Verver S, Warren RM, Munch Z, Vynnycky E, van Helden PD, Richardson M, et al. Transmission of tuberculosis in a high incidence urban community in South Africa. *Int J Epidemiol.* 2004 Apr;33(2):351-7.

19. Rocha C, Montoya R, Zevallos K, Curatola A, Ynga W, Franco J, et al. The Innovative Socio-economic Interventions Against Tuberculosis (ISIAT) project: an operational assessment. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2011 Jun;15 Suppl 2:S50-7.
20. 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 Apr;35(4):907-14.
21. Rieder HL. What knowledge did we gain through The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease in 2008 on the epidemiology of tuberculosis? *Int J Tuberc Lung Dis.* 2009 Oct;13(10):1219-23.
22. Saunders MJ, Wingfield T, Tovar MA, Baldwin MR, Datta S, Zevallos K, et al. A score to predict and stratify risk of tuberculosis in adult contacts of tuberculosis index cases: a prospective derivation and external validation cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2017 Aug 18.
23. Augustynowicz-Kopec E, Jagielski T, Kozinska M, Kremer K, van Soolingen D, Bielecki J, et al. Transmission of tuberculosis within family-households. *J Infect.* 2012 Jun;64(6):596-608.
24. Farnia P, Masjedi MR, Varahram M, Mirsaeidi M, Ahmadi M, Khazampour M, et al. The recent-transmission of *Mycobacterium tuberculosis* strains among Iranian and Afghan relapse cases: a DNA-fingerprinting using RFLP and spoligotyping. *BMC Infect Dis.* 2008;8:109.
25. Dahle UR, Nordtvedt S, Winje BA, Mannsaaker T, Heldal E, Sandven P, et al. Tuberculosis in contacts need not indicate disease transmission. *Thorax.* 2005 Feb;60(2):136-7.
26. Diriba B, Berkessa T, Mamo G, Tedla Y, Ameni G. Spoligotyping of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Ethiopia. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2013 Feb;17(2):246-50.
27. Gideon HP, Flynn JL. Latent tuberculosis: what the host "sees"? *Immunol Res.* 2011 Aug;50(2-3):202-12.

28. Wingfield T, Schumacher SG, Sandhu G, Tovar MA, Zevallos K, Baldwin MR, et al. The seasonality of tuberculosis, sunlight, vitamin D, and household crowding. *J Infect Dis.* 2014 Sep 01;210(5):774-83.
29. Guwatudde D, Nakakeeto M, Jones-Lopez EC, Maganda A, Chiunda A, Mugerwa RD, et al. Tuberculosis in household contacts of infectious cases in Kampala, Uganda. *Am J Epidemiol.* 2003 Nov 1;158(9):887-98.
30. Mamiya H, Schwartzman K, Verma A, Jauvin C, Behr M, Buckeridge D. Towards probabilistic decision support in public health practice: Predicting recent transmission of tuberculosis from patient attributes. *J Biomed Inform.* 2014 Feb;53:237-42.
31. Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). Colección de Metodologías Estadísticas: Metodología para la medición de la pobreza en el Perú. Año 1 No 02. [10 noviembre 2016; cited]; Available from: www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/metodologias/pobreza01.pdf.
32. Howe LD, Hargreaves JR, Huttly SR. Issues in the construction of wealth indices for the measurement of socio-economic position in low-income countries. *Emerg Themes Epidemiol.* 2008;5:3.
33. Boccia D, Hargreaves J, Ayles H, Fielding K, Simwanga M, Godfrey-Faussett P. Tuberculosis infection in Zambia: the association with relative wealth. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 Jun;80(6):1004-11.
34. Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). Censos nacionales XI de población y VI. Perfil socioeconómico de la provincia constitucional del Callao. 2007.
35. Wingfield T, Boccia D, Tovar M, Gavino A, Zevallos K, Montoya R, et al. Defining catastrophic costs and comparing their importance for adverse tuberculosis outcome with multi-drug resistance: a prospective cohort study, Peru. *PLoS Med.* 2014 Jul;11(7):e1001675.
36. Valdez W, Miranda J. Carga de enfermedad en el Perú: Estimación de los años de vida saludables perdidos. Dirección General de Epidemiología Ministerio de Salud Lima;. 2014.
37. Kent PT KG. Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. Atlanta, GA: Centers for Disease Control. 1985.

38. Toit K, Mitchell S, Balabanova Y, Evans CA, Kummik T, Nikolayevskyy V, et al. The Colour Test for drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis strains. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2012 Aug;16(8):1113-8.
39. Caviedes L, Delgado J, Gilman RH. Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2002 May;40(5):1873-4.
40. Moore DA, Evans CA, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, Vivar A, et al. Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. *N Engl J Med*. 2006 Oct 12;355(15):1539-50.
41. Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). Análisis comparativo de los niveles de vida 1993-1998. 2000 [updated 2000; cited 2017]; Available from: <http://proyectos.inei.gov.pe/web/biblioineipub/bancopub/Est/Lib0075/anex4.htm>.
42. Fox GJ, Barry SE, Britton WJ, Marks GB. Contact investigation for tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2012 Jan;41(1):140-56.
43. Sia IG, Buckwalter SP, Doerr KA, Lugos S, Kramer R, Orillaza-Chi R, et al. Genotypic characteristics of Mycobacterium tuberculosis isolated from household contacts of tuberculosis patients in the Philippines. *BMC Infect Dis*. 2013;13:571.
44. Kubin M, Mezensky L, Prikazsky V, Kremer K, van Soolingen D. Family outbreaks of tuberculosis in South Moravia, a low incidence area of the Czech Republic. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2001 May;5(5):426-31.
45. Grandjean L, Crossa A, Gilman RH, Herrera C, Bonilla C, Jave O, et al. Tuberculosis in household contacts of multidrug-resistant tuberculosis patients. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011 Sep;15(9):1164-9, i.
46. Bryant JM, Harris SR, Parkhill J, Dawson R, Diacon AH, van Helden P, et al. Whole-genome sequencing to establish relapse or re-infection with Mycobacterium tuberculosis: a retrospective observational study. *Lancet Respir Med*. 2014 Dec;1(10):786-92.

47. Martinez L, Arman A, Haveman N, Lundgren A, Cabrera L, Evans CA, et al. Changes in tuberculin skin test positivity over 20 years in periurban shantytowns in Lima, Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2013 Sep;89(3):507-15.
48. Andrews JR, Basu S, Dowdy DW, Murray MB. The epidemiological advantage of preferential targeting of tuberculosis control at the poor. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2015 Apr;19(4):375-80.
49. Behr MA, Hopewell PC, Paz EA, Kawamura LM, Schechter GF, Small PM. Predictive value of contact investigation for identifying recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Aug;158(2):465-9.
50. Kasaie P, Andrews JR, Kelton WD, Dowdy DW. Timing of tuberculosis transmission and the impact of household contact tracing. An agent-based simulation model. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014 Apr 1;189(7):845-52.
51. Gupta A, Kulkarni S, Rastogi N, Anupurba S. A study of *Mycobacterium tuberculosis* genotypic diversity & drug resistance mutations in Varanasi, north India. *Indian J Med Res.* 2014 Jun;139(6):892-902.
52. Roetzer A, Diel R, Kohl TA, Ruckert C, Nubel U, Blom J, et al. Whole genome sequencing versus traditional genotyping for investigation of a *Mycobacterium tuberculosis* outbreak: a longitudinal molecular epidemiological study. *PLoS Med.* 2013;10(2):e1001387.
53. Surkova L, Horevich HL, Titov LP, Sahalchik E, Arjomandzadegan M, Alinejad S, et al. A study on demographic characteristics of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Belarus. *Int J Mycobacteriol.* Jun;1(2):75-81.
54. Raviglione M. *Tuberculosis: The essentials.* 4 ed. US: Taylor & Francis group; 2010.

ANEXOS

Anexo 1

Protocolo para realizar "Spoligotyping"

1.-Materiales

Reactivos	[stock]	[final]	Vol. Final para 25 tubos		
			Vol.1 tubo.50ul	Vol.1 tubo	Vol. 45 tubos
agua	-	-	27	13.5	607.5
Buffer	10x	1x	5	2.5	112.5
dNTPs	2.5mM	.25mM	5	2.5	112.5
MgCl	50mM	1.5	1.5	0.75	33.75
Primer DRa	5uM	0.4uM	4	2	90
Primer DRb	5uM	0.4uM	4	2	90
Taq	5u/ul	0.1	1	0.5	22.5
ADN	-		2.5	1.25	2

2.- Procedimientos

Alicuotar: 23uL del master mix + 2uL de ADN

Programa de amplificación: Spoli

Ciclos de amplificación: 94°C x 5min
94°C x 1min
55°C x 1min 31 ciclos
72°C x 45seg
72°C x 5min
12°C x 5 horas

Hibridización con productos de PCR y detección

A) Preparación de las muestras a evaluar en la membrana:

- Agregar en un eppendorfs de 0.5ml, que contiene 150 ul de 2XSSPE/0.1 % de SDS, 20 Ul del producto de PCR
- Desnaturalizar por calor el producto de PCR diluido, durante 10 minutos a 100 °C e incubar en hielo inmediatamente.

Preparación de la membrana en el Blotter

Lavar la membrana con 60 ml 2xSSPE/0.1% SDS a 60 °C (en recipiente)

Lavar la membrana durante 10 minutos a 60 °C en 60 ml de 2xSSPE/0.1% SDS.
(Botella de hibridización).

Repetir el paso de lavado anterior.

Colocar la membrana en un miniblotter, lavado con 2xSSPE/0.1% SDS a 60°C, de tal manera que los pozos del miniblotter se encuentren en forma paralela con la línea marcada de la membrana.

Colocar un amortiguador de espuma (cushion), atornillar firmemente pero no demasiado.

Retirar el agua residual de los carriles del miniblotter, por aspiración con el uso de una bomba al vacío.

Hibridización del producto de PCR en la membrana.

Llenar los carriles con el producto diluido de PCR (150ul) evitando las burbujas de aire

Llenar la primera y la última línea con 2xSSPE/0.1% SDS.

Hibridizar durante 60 minutos a 60°C en una superficie horizontal.

Lavado eventual hibridización cruzada.

Retirar las muestras del miniblotter por aspiración con una bomba de vacío y retirar la membrana del miniblotter.

Lavar la membrana con 100 ml de 2xSSPE/0.5% SDS a 60 °C.

Lavar la membrana durante 10 minutos a 60 °C en 60 ml 2xSSPE/0.5% SDS.
(Botella de hibridización)

Repetir el paso del lavado anterior.

Incubación con Estreptavidina – Peroxidasa en la botella de hibridización.

Lavar la membrana en 60 ml de 2xSSPE/0.5% SDS a 42°C. (en la misma botella de hibridización), no usar temperaturas altas para prevenir la inactivación de la peroxidasa.

Preparar el conjugado de la sgte manera: Agregar 15 ul del conjugado estreptavidina -peroxidasa a 24 ml de 2xSSPE/0.5% SDS.

Retirar el buffer previo y agregar los 24ml de la solución preparada.

Incubar de 45 a 60 minutos a 42 °C.

Lavar la membrana en 60 ml de 2xSSPE/0.5% SDS a 42 °C en una botella que permita la extracción rápida de la membrana.

Lavar la membrana durante 10 minutos a 42 °C en 60 ml de 2xSSPE/0.5% SDS.

Repetir el paso de lavado anterior.

Revelado

Lavar la membrana en 100 ml de 2xSSPE. (en recipiente)

Lavar la membrana durante 10 minutos a temperatura ambiente con 200 ml de 2xSSPE.

Repetir el lavado anterior y secar el exceso de buffer en papel filtro.

Preparar la solución de quimioluminiscencia del producto, mezclar 20 ml de c/u de los dos productos.

Agregar la solución de quimioluminiscencia a la membrana e incubarlo 3 min, mantener la membrana en movimiento y en contacto con la solución.

Retirar la membrana y secar el exceso de solución en papel filtro.

Envolver la membrana evitando la formación de burbujas en “Saran-wrap” y colocarlo en un cassette

En oscuridad colocar un film encima de la membrana y cerrar el casete. Es muy importante no mover el film cuando hizo contacto con la membrana.

Exponerlo a rayos X durante el tiempo necesario; si la membrana es nueva la exposición puede ser 10min, pero cuando la membrana tenga más usos, la exposición puede ser desde 30min a toda la noche.

Luego abrir el casete, retirar el film y colocarlo en la solución reveladora hasta que aparezcan los puntos negros bien definidos. Luego pasar a la solución fijadora aproximadamente 1 minuto. Luego eliminar el exceso con chorro de agua de caño y secar.

Stripping

Enjuagar la membrana con 100 ml de SDS 0.95% a 76° C en un pírex.

Pasar la membrana a la botella y lavarla 30 min a 76° C 60 ml de 0.95% de SDS.

Repetir el paso del lavado anterior.

Preparado de la membrana para la conservación.

Sacar la membrana de la botella a un pirex y enjuagarla en 100 ml de EDTA 20mM pH 8 a temperatura ambiente.

Lavar la membrana durante 15 minutos a temperatura ambiente con 200 ml de EDTA 20mM pH 8.

Guardar la membrana a 4 °C en el mismo recipiente o en una bolsa, pero siempre con EDTA 20 mM pH 8.

I) Lectura

Anexo 2

Descripción de los espoligotipos del caso índice y su correspondiente caso secundario (N= 90)

fila	Espoligotipo del caso índice	Espoligotipo del caso secundario	Cepa del caso índice	Cepa del caso secundario	Concordancia entre cepas
1	677737207760771	733177607700171			discordante
2	77777777720771	77777607760771	Haarlem3	LAM9	discordante
3	77777607560731	777774077020771			discordante
4	77777777760571	77777777760771		T1	discordante
5	700036777760771	777776777760771	X3-Variant1		discordante
6	77777777720771	77777477760771	Haarlem3	H37Rv	discordante
7	776177607760731	777774077020771			discordante
8	776177607760771	77777407560731	LAM3		discordante
9	704003347760471	77777407560731		LAM3	discordante
10	77777777720771	77777477760771	Haarlem3	H37Rv	discordante
11	77777777720771	77777777760771	Haarlem3	T1	discordante
12	77777777720771	00000000003771	Haarlem3	Beijing	discordante
13	777737607760771	77777777760771	LAM5	T1	discordante
14	00000000003771	77777777760771	Beijing	T1	discordante
15	777774077560771	776177607760771		LAM3	discordante
16	776177607760771	77777407560731	LAM3		discordante
17	00000000003771	77777777760371	Beijing		discordante
18	77777407560731	67777607760771			discordante
19	77777777720751	77777777720771	X1	Haarlem3	discordante
20	777740777760771	77777774020771		Haarlem1	discordante
21	777727607760771	77777774020771		Haarlem1	discordante
22	77777777720751	77777777760771	X1	T1	discordante

23	777777407560731	776177607760771		LAM3	discordante
24	776177607760771	77777777720771	LAM3	Haarlem3	discordante
25	77773777720771	77777777760771		T1	discordante
26	776177607760771	000000000003771	LAM3	Beijing	discordante
27	777774077560771	777677607760771			discordante
28	000000000003771	77777777720771	Beijing	Haarlem3	discordante
29	77777777720131	77777777720131			concordante
30	77777777720771	77777777720771	Haarlem3	Haarlem3	concordante
31	77777777760771	77777777760771	T1	T1	concordante
32	777777407560731	777777407560731			concordante
33	700036777760771	700036777760771	X3-Variant1	X3-Variant2	concordante
34	700036777760771	700036777760771	X3-Variant1	X3-Variant1	concordante
35	77777777720771	77777777720771	Haarlem3	Haarlem3	concordante
36	77777777720771	77777777720771	Haarlem3	Haarlem3	concordante
37	77777707720771	77777707720771			concordante
38	700036776360771	700036776360771			concordante
39	77777777760771	77777777760771	T1	T1	concordante
40	777777607760731	777777607760731			concordante
41	777777607760771	777777607760771	LAM9	LAM9	concordante
42	77777777720771	77777777720771	Haarlem3	Haarlem3	concordante
43	77777777720771	77777777720771	Haarlem3	Haarlem3	concordante
44	776177607760771	776177607760771	LAM3	LAM3	concordante
45	777777774020771	777777774020771	Haarlem1	Haarlem1	concordante
46	777740777760771	777740777760771			concordante
47	777774077560771	777774077560771			concordante
48	677737207760771	677737207760771			concordante
49	777777407560731	777777407560731			concordante
50	700036777760771	700036777760771	X3-Variant1	X3-Variant1	concordante
51	000000000003771	000000000003771	Beijing	Beijing	concordante
52	77777777720771	77777777720771	Haarlem3	Haarlem3	concordante
53	77777777720771	77777777720771	Haarlem3	Haarlem3	concordante

54	77777777720771	77777777720771	Haarlem3	Haarlem3	concordante
55	777776777660731	777776777660731			concordante
56	777777407560731	777777407560731			concordante
57	77777777760771	77777777760771	T1	T1	concordante
58	777777407560731	777777407560731			concordante
59	700036777760771	700036777760771	X3-Variant1	X3-Variant1	concordante
60	77777777720131	77777777720131			concordante
61	777774070000171	777774070000171			concordante
62	77777777720771	77777777720771	Haarlem3	Haarlem3	concordante
63	77777777720771	77777777720771	Haarlem3	Haarlem3	concordante
64	000000000003771	000000000003771	Beijing	Beijing	concordante
65	777777743700000	777777743700000			concordante
66	777777743700000	777777743700000			concordante
67	700036777760771	700036777760771	X3-Variant1	X3-Variant1	concordante
68	777777607560731	777777607560731			concordante
69	776177607760731	776177607760731			concordante
70	77777777720751	77777777720751	X1	X1	concordante
71	77777777720751	77777777720751	X1	X1	concordante
72	000000000003771	000000000003771	Beijing	Beijing	concordante
73	77777777760771	77777777760771	T1	T1	concordante
74	776177607760700	776177607760700			concordante
75	776177607760771	776177607760771	LAM3	LAM3	concordante
76	000000000003771	000000000003771	Beijing	Beijing	concordante
77	700036777760771	700036777760771	X3-Variant1	X3-Variant1	concordante
78	77777777720131	77777777720131			concordante
79	777777607760771	777777607760771	LAM9	LAM9	concordante
80	776177607760771	776177607760771		LAM3	concordante
81	677777607760771	677777607760771			concordante
82	757777774020771	757777774020771			concordante
83	777777407560731	777777407560731			concordante
84	77777777720751	77777777720751	X1	X1	concordante

85	777777407560731	777777407560731			concordante
86	776377777740731	776377777740731			concordante
87	577777607760731	577777607760731			concordante
88	777737607760771	777737607760771	LAM5	LAM5	concordante
89	760177777720771	760177777720771			concordante
90	777777557760771	777777557760771			concordante

*Los espoligotipos están descritos en sistema octagonal.

Anexo 3

Análisis secundarios

Análisis multivariado la discordancia de cepas utilizando la variable tiempo sin transformación en categorías (dato crudo)

--En el análisis multivariado la discordancia de cepas se asoció independientemente a una diferencia en días entre el diagnóstico del caso índice y del caso secundario (RR [IC95%]:0.99 [0.99-0.99], p=0.031) y baciloscopia negativa del caso índice (1.61[1.02-2.54], p=0.039)

Análisis univariado de la discordancia de cepas utilizando la variable independiente el año en que el caso secundario desarrollo TB.

-- En el análisis univariado la discordancia de cepas no se asoció al año en el que el caso secundario fue diagnosticado de TB (RR [IC95%]:0.95 [0.78-1.16], p=0.635)