



FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

# **GRADO EN MEDICINA**

## **TRABAJO FIN DE GRADO**

**Autor/a:**

**Director/es:**

**Santander,**

**20**

## ÍNDICE

Parte I: INTRODUCCIÓN .....	3
1.Paleomicrobiología, sus métodos y estado actual .....	3
2.La tuberculosis .....	6
Parte II: IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE MUESTRAS TB EN LA HISTORIA .....	16
1.Identificación tuberculosis mediante RFLPs visualizados en electroforesis en gel .	16
2.Amplificación de ADN por PCR .....	17
3.El análisis MIRU-VNTR (Unidad repetitiva de identificación de micobacterias-VNTR).	..17
4.PCR tiempo real .....	18
5.Biomarcadores de lípidos de la pared celular .....	18
6.Detección de antígenos y anticuerpos .....	19
7.Next Generation Sequencing (NGS ).....	19
Parte III: LA CUESTIÓN DEL ORIGEN DE LA TUBERCULOSIS .....	19
1.El salto de la paleopatología tuberculosa a las técnicas de secuenciación modernas ¿Es la tuberculosis una zoonosis?.....	20
2.Datación molecular bayesiana y el reloj molecular .....	27
Parte IV: HISTORIA EVOLUTIVA, DEMOGRÁFICA Y DISEMINACIÓN DEL MTBC .....	33
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	41
BIBLIOGRAFÍA .....	44

## **"PALEOMICROBIOLOGIA DE LAS POBLACIONES HUMANAS: EL CASO DE LA TUBERCULOSIS"**

*Abstract.* With the growth of the number of inhabitants on the planet and the intercontinental connections, endemic diseases can become global, causing epidemic outbreaks or even global pandemics. To understand how an infectious agent spreads, it is necessary not only to know its biological details and the pathology it causes, but also to attend to the relationships it establishes with its host. Paleomicrobiology studies the emergence and spread of infectious diseases throughout human history, in an attempt to clarify the factors that determine the appearance of epidemic diseases. Among human pathogens, few have a greater impact and common evolutionary history than *Mycobacterium tuberculosis*. Using different molecular techniques, including ancient DNA sequencing or evolution modeling based on modern genomic studies, it is now possible to reconstruct the history of this pathogen. Faced with previous hypotheses, which postulated the evolution of *M. tuberculosis* as a zoonosis originating in cattle, current paleomicrobiological studies have revealed a much more complex evolution. The results indicate that the main factors in the evolution of tuberculosis lie in the sociodemographic factors of its host: the human being. Demographics, exchange routes, and co-infection with other pathogens are revealed as critical factors in the spread and virulence of infectious diseases.

*Resumen.* Con el crecimiento del número de habitantes en el planeta y de las conexiones intercontinentales, enfermedades endémicas pueden volverse globales, provocando brotes epidémicos o incluso pandemias mundiales. Para entender cómo se propaga un agente infeccioso es necesario no solo conocer sus detalles biológicos y la patología que causa, sino atender también a las relaciones que establece con su hospedador. La paleomicrobiología estudia el surgimiento y propagación de enfermedades infecciosas a lo largo de la historia humana, en un intento de esclarecer los factores que condicionan la aparición de enfermedades epidémicas. Entre los patógenos humanos, pocos tienen un impacto y una historia evolutiva en común con mayor trascendencia que *Mycobacterium tuberculosis*. Mediante distintas técnicas moleculares, que incluyen la secuenciación del ADN antiguo o la elaboración de modelos de evolución a partir de estudios genómicos modernos, hoy en día es posible reconstruir la historia de este patógeno. Frente a hipótesis anteriores, que postulaban la evolución de *M. tuberculosis* como una zoonosis procedente del ganado, los estudios paleomicrobiológicos actuales han desvelado una evolución mucho más compleja. Los resultados indican que los principales factores en la evolución de la tuberculosis radican en factores sociodemográficos de su hospedador: el ser humano. La demografía, las rutas de intercambio y la co-infección con otros patógenos se revelan así como factores críticos en la propagación y virulencia de las enfermedades infecciosas.

## **Parte I: INTRODUCCIÓN**

### **1. Paleomicrobiología, sus métodos y estado actual**

La Paleomicrobiología estudia los microorganismos en la antigüedad a partir de muestras humanas o ambientales, incluso de especímenes datados hace miles de años que persisten conservados en forma de moléculas de ADN o proteínas. Es una ciencia que nace de la fusión de múltiples disciplinas, tales como la microbiología médica, la antropología, la historia y ciencias afines como la arqueozoología. En general estos microorganismos antiguos no son cultivables, por lo que su estudio se centra en el análisis de los restos de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos de estos microorganismos que se preservan en el tiempo. De todas estas moléculas, la fuente más importante de información en Paleomicrobiología es el estudio del ADN antiguo (45), debido a la gran información que contiene, así como su capacidad para persistir en el tiempo.

Las fuentes de las que se suelen obtener muestras de DNA antiguo son los coprolitos y de los restos de huesos, aunque estos segundos pueden contener solo pequeñas cantidades debido a la degradación enzimática. Uno de los desafíos más importantes de la paleomicrobiología es la contaminación del ADN antiguo con el ADN contemporáneo. Para ello la extracción y análisis debe realizarse en condiciones controladas de extrema limpieza.

Hay que tener en cuenta que a diferencia de las células vivas donde el ADN se somete a procesos de reparación enzimática, cuando se produce la muerte celular el ADN se degrada rápidamente por enzimas derivadas tanto del huésped como de los microorganismos ambientales. Esto provoca cambios acumulativos a lo largo del tiempo (diagénesis) en el ADN antiguo, debido a las lesiones oxidativas e hidrolíticas (1).

Tras la inhumación se produce un mayor daño al ADN a través de contaminantes microbianos y fúngicos exógenos que se filtran en los restos con el tiempo. Las condiciones bajo las cuales se degrada o conserva el ADN pueden variar drásticamente según la geología regional, el clima y el tiempo. El factor fundamental en la preservación del ADN antiguo son las condiciones ambientales próximas (cuevas frente a sitios al aire libre, profundidad de enterramiento y humedad) y a nivel microscópico (contenido mineral y exposición). Factores locales, como la temperatura, el pH o la disponibilidad de agua y oxígeno, así como sus fluctuaciones a lo largo del tiempo, tienen un fuerte impacto a la hora de estudiar la muestra (45,46). Además, la detección del ADN de patógenos antiguos depende también en gran medida de muchos factores independientes de la edad cronológica de las muestras o de su ambiente como son: la susceptibilidad del huésped a una infección particular; nivel de patógeno en la sangre o tejido (es decir, bacteriemia, viremia o parasitemia); respuestas inmunes diferenciales; presencia y nivel de infección en el momento de la muerte; estado nutricional (resultado de hambruna o estado social); y coinfección o comorbilidad previa o en curso (46).

Las moléculas de ADN antiguo son cortas, generalmente entre 30 y 60 pares de bases de largo, como resultado del daño hidrolítico y oxidativo. Además, las nucleobases que contienen aminas, como las citosinas (y la adenina y la guanina en menor grado), que se encuentran en salientes monocatenarios, están sujetas a desaminación hidrolítica, dando como resultado uracilo. En los procesos de amplificación que se llevan a cabo en el laboratorio para analizar las moléculas de ADN antiguo, los uracilos se copian posteriormente como timinas en reacciones de amplificación dando lugar a lesiones de codificación errónea de C-a-T y G-a-A. El ADN antiguo aislado de restos óseos es una mezcla compleja de ADN endógeno (objetivo) con ADN exógeno (no objetivo) que se ha abierto camino en los restos a lo largo de su historia de entierro. De igual modo que la amplificación puede ser errónea por la desaminación hidrolítica, hay que tener en cuenta que el daño oxidativo, especialmente a las pirimidinas, puede dar lugar a la formación de sustancias como las hidantoínas, que bloquean la amplificación por la PCR (4).

Por lo general, debido a las peculiaridades del ADN antiguo, se estima que entre el 60% y el 90% del ADN se pierde durante la extracción, la preparación de la biblioteca y los numerosos pasos de purificación; estimándose que sólo se obtiene al final para el estudio entre un 1% -10% de muestra objetiva, con una fracción de patógeno detectable por lo general mucho menor del 0,5% del ADN total (4). Aunque en los nódulos calcificados, los huesecillos del oído y el permafrost se han encontrado muestras que permiten una mejor conservación del ADN (47, 48).

El nivel de conservación de la muestra depende en gran medida de la naturaleza del microorganismo estudiado. Distintos microorganismos experimentan procesos de degradación más o menos intensos. El caso más extremo es el de los virus de ARN. La presencia de RNAsas, muy abundantes en el suelo, producen una rápida degradación de las moléculas de ARN limita los estudios evolutivos de patógenos como el virus de la influenza, el virus del sarampión, el VIH y el virus de la fiebre amarilla.

Aunque la preservación del ADN bacteriano es mayor que la de los virus, depende del tipo de bacteria a estudio. Las bacterias gram positivas al tener una pared celular mucho más gruesa que las bacterias gram negativas, permiten una conservación más prolongada de su ADN. Algunas bacterias gram positivas como las *Mycobacterias*, *Nocardia* y *Corynebacterium* tienen una compleja pared celular rica en lípidos (como los ácidos micólicos) que favorecen su preservación debido a la resistencia que confieren frente a detergentes y antibacterianos comunes. Además, la pared celular de las *Mycobacterias* como es el caso de la *Mycobacterium tuberculosis* y *M. leprae* contienen una capa de peptidoglicano "*lipoarabinomano*" (LAM) cuya estructura y función es similar a la encontrada en los lipopolisacáridos de las bacterias gram negativas (2). El complejo peptidoglicano-ácido micólico-arabino-galactano forma el esqueleto de las paredes celulares de las micobacterias confiriéndoles las características hidrófobas que inhiben la permeabilidad celular y les confiere antigenicidad, de tal modo que, aunque su crecimiento en general es muy lento en comparación con las bacterias no ácido alcohol resistentes, les permite persistir a lo largo de los años en ambientes más extremos.

Otros patógenos de importancia histórica son más difíciles de estudiar debido a la baja conservación de sus restos. *Treponema pallidum pallidum* y *pertenue* (agentes causantes de la sífilis y el pian, respectivamente) carecen por de lipopolisacárido en su membrana celular externa. Esto, unido a la baja carga patógena de *Treponema* en las últimas etapas de la infección, impidió en gran medida su identificación en restos antiguos hasta la reciente aplicación de métodos de secuenciación de alto rendimiento.

El registro arqueológico comprende, en orden decreciente de frecuencia, elementos esqueléticos (huesos y dientes), tejido blando momificado, cabello y trazas fósiles asociadas a humanos (por ejemplo, heces, abscesos y sedimentos asociados). Uno de los restos más fértiles en ADN microbiano son los dientes. Al estar la pulpa muy vascularizada, durante una bacteriemia los microorganismos persisten en el interior de la misma durante más tiempo, siendo una muestra muy útil en infecciones hematógenas como puede ser la peste bubónica. Los dientes también son una fuente muy importante de información sobre la microbiota comensal. La reconstrucción de genomas de patógenos comensales y nuestros microbiomas antiguos mediante la placa dental calcificada de restos humanos, ha permitido demostrar la composición cambiante de la microbiota oral durante las transiciones importantes, como son la caza y la recolección a la agricultura hace 10.000 años, así como la antigüedad de los genes de resistencia a antibióticos que determinan la susceptibilidad a determinadas enfermedades en el pasado. A pesar de todos estos desafíos, gracias a la persistencia propia a la degradación natural del ADN y a las nuevas técnicas de preservación del mismo, se puede analizar la virulencia de los patógenos y su adaptación a los distintos hábitats y vectores a partir de muestras antiguas. Actualmente, se realizan análisis no sólo de restos humanos, sino también de muestras ambientales que incluyen suelo, hielo polar, plantas, insectos y animales, que describen el ecosistema con el que convive la muestra a estudio, pudiendo así caracterizar zoonosis y trazar la epidemiología de las enfermedades infecciosas en los siglos pasados.

Uno de los objetivos más importantes de la Paleomicrobiología es reconstruir la historia natural de las enfermedades infecciosas, deducidas a partir de los datos evolutivos obtenidos de reconstrucciones filogenéticas, o analizando directamente secuencias genéticas que se remontan a miles de años. La aportación de la secuenciación genómica proporcionó una fuente rica de información para estudiar la biología evolutiva que ha despertado un gran interés a raíz de las recientes epidemias y pandemias. Hasta 2011, la detección de patógenos a partir de restos arqueológicos se basaba casi en su totalidad en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pero debido a las complicaciones de la conservación y la patogenia, es frecuente que se obtengan resultados negativos.

Sin embargo los nuevos métodos de secuenciación masiva han permitido la recuperación de genomas más completos. Actualmente se dispone de la secuenciación casi completa de tres patógenos históricamente interesantes: el causante de la peste bubónica premoderna (*Yersinia pestis*), el causante la viruela (virus *Variola*) y el del cólera (*Vibrio cholerae*), así como de tres agentes patógenos humanos endémicos igualmente importantes: *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculosis), *Mycobacterium leprae* (lepra) y *Treponema pallidum pallidum* (sífilis). Los datos genómicos de estos patógenos han complementado el trabajo anteriormente realizado por los paleopatólogos ampliando así la comprensión de la enfermedad infecciosa.

Durante los últimos 20 años se ha demostrado que los estudios de ADN antiguo aportan información relevante sobre los orígenes y la historia de las enfermedades infecciosas, tanto endémicas que abarcan milenios (la malaria, la lepra y la tuberculosis), así como las enfermedades pandémicas esporádicas y devastadoras (las recurrencias de la peste en todo el mundo). Por ende, la comparación de los genomas de distintos patógenos permite ver si las tasas de letalidad se asocian a rasgos de virulencia codificados genéticamente o factores ambientales o del huésped (o ambos), debidos a la presencia o a la ausencia de características genéticas determinantes.

La tasa de letalidad es el porcentaje de personas con cierta enfermedad que fallecen en un tiempo determinado tras el diagnóstico de dicha enfermedad (6). Pero existen enfermedades con evolución insidiosa (de modo asintomático) durante un largo periodo de tiempo, por lo que es difícil de precisar el comienzo del proceso de la enfermedad. Por estas razones, en enfermedades con largo periodo asintomático o de latencia se recurre a calcular la tasa de mortalidad, que tiene en cuenta en el denominador a toda la población con riesgo de morir de la enfermedad, es decir, incluye tanto aquellos que presentan enfermedad como a los que no la presentan (pero que tienen riesgo de padecerla). A partir de cálculos epidemiológicos se puede estimar la virulencia de la enfermedad, que junto con el estudio genómico aporta información medible sobre el grado o capacidad que tiene un microorganismo para causar daño.

A nivel genómico, la virulencia puede ser impulsada por la presencia de plásmidos, elementos genéticos móviles o polimorfismos que varían en función del hospedador. Un mayor acceso a los genomas microbianos antiguos ayudará a comprender el origen y distribución de ciertos alelos en los humanos; y permitirá demostrar objetivamente su efecto sobre la adaptación de los patógenos a las distintas poblaciones. Por tanto, es importante el estudio del ADN antiguo para la caracterización de los organismos causantes de las grandes epidemias y pandemias que determinaron la evolución humana y la modulación del sistema humano tal cual lo conocemos hoy.

Un ejemplo claro de coevolución entre un patógeno y las poblaciones humanas es el de la tuberculosis. Datos de secuenciación genómica de restos Neandertales han puesto de manifiesto que, aunque los Neandertales contribuyeron sólo entre el 1,5% y el 2,1% del genoma de la población euroasiática, su aporte genético jugó un papel importante en la familia de genes HLA clase I, implicados en la inmunidad frente a las infecciones. En estos genes, alelos arcaicos procedentes de los Neandertales representan más del 50% de los alelos en Europa y Asia. Se ha sugerido que estas variantes arcaicas de HLA clase I fueron seleccionados positivamente por su efecto protector frente a enfermedades infecciosas como la tuberculosis (5, 49).

## **2. La tuberculosis**

La tuberculosis, también conocida en tiempos históricos como la tisis, ha acompañado al ser humano a lo largo de la historia. El primer caso de tuberculosis en restos históricos fue reportado por Paul Bartels, en 1907, a partir de varias vértebras dorsales encontradas en un cementerio cerca de Heidelberg (7). Estos restos correspondían a un

hombre que vivió hacia el 5000 a.C. Sin embargo, esta y otras identificaciones iniciales se basaban en análisis de paleopatología, por lo que los resultados pueden ser controvertidos. Los síntomas de la enfermedad cuando se obtienen de los registros históricos o restos óseos, rara vez son diagnósticos y durante mucho tiempo han generado dudas y debates sobre la naturaleza de la enfermedad pasada y la experiencia epidémica.

Sin embargo, gracias a los estudios moleculares se han conseguido datar restos anteriores a la escritura en África del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). La evolución de la especie humana también se ha ido desgranando con los avances científicos permitiendo realizar árboles filogenéticos que expliquen el desarrollo del *Homo sapiens* y sus migraciones. Esto permite seguir las huellas tanto del hombre como del bacilo tuberculoso para datar cuando la tuberculosis se convirtió en un patógeno humano y las asociaciones biogeográficas que reflejan las oleadas migratorias. Esta larga historia coevolutiva es cardinal para comprender la relación entre huésped-patógeno, incluyendo componentes demográficos pasados y aquellos actualmente en curso; así como la arquitectura genética del sistema inmunológico del anfitrión.

Además, la aplicación de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva aplicadas al estudio paleomicrobiológico han permitido el reconocimiento de coinfecciones, infecciones múltiples y la categorización de linajes. Estos datos, junto a los conocimientos en antropología médica y arqueología biomédica, han logrado recopilar información sobre la dieta humana, sociedad, ubicación, y migraciones, así como el contexto histórico que explica la infección de la tuberculosis y susceptibilidad del huésped.

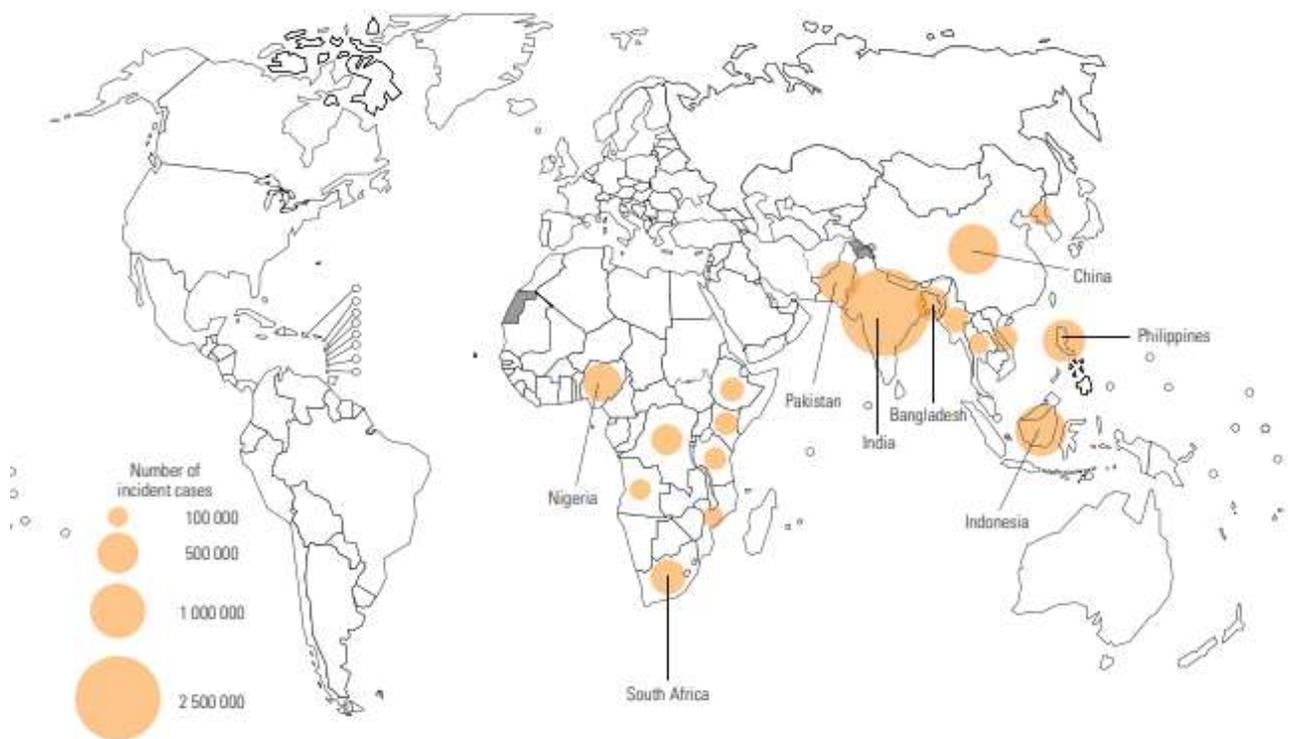
Cabe destacar el aumento durante las últimas décadas de la resistencia a los antimicrobianos (RAM) sobretodo a nivel local, que constituye un desafío para el control de la tuberculosis en ausencia de una vacuna eficaz. La dificultad en el manejo y tratamiento de esta enfermedad en la era de los antibióticos es debida a la creciente aparición de resistencias a los mismos, en combinación con el enorme reservorio que el patógeno mantiene en las poblaciones humanas a través de una infección latente. Esto hace necesario la comprensión de sus orígenes y su capacidad de persistencia a lo largo de la historia en los humanos, para intentar predecir el papel que la tuberculosis jugará en el futuro.

En particular, entender la coevolución entre los distintos linajes de *M. tuberculosis* y los humanos puede ayudarnos a predecir el comportamiento de cepas actuales. La comprensión de la evolución de los linajes tiene importantes repercusiones clínicas. Por ejemplo, dentro de los siete linajes actuales de *M. tuberculosis*, el linaje Beijing destaca por su virulencia y su capacidad de resistencia a los antibióticos. Entender qué mecanismos llevaron a la progresión de unos linajes y la extinción de otros puede ser fundamental en la lucha contra la tuberculosis.

La tuberculosis tiene mucha relevancia en nuestros días. Se estima que un tercio de la población mundial tiene una infección tuberculosa latente. Es un problema de salud importante en la actualidad ya que anualmente hace enfermar a 10 millones de personas y provoca 1.4 millones de muerte (OMS 2019). La disparidad entre infectados y enfermos

es un factor que complica el manejo de la epidemia, ya que se estima que sólo el 15% de los infectados por *M. tuberculosis* desarrollarán la enfermedad tuberculosa durante su vida. De los cuales 5% presentarán síntomas durante la primoinfección y el 10% restante serán consecuencia de una reactivación posterior por disminución de la respuesta inmune (8). Esta capacidad de permanecer latente en nuestro organismo ha contribuido sin duda a su perpetuación a lo largo de la historia.

Los 30 países con alta carga de TB representaron el 86% de todos los casos incidentes estimados en todo el mundo, y ocho de estos países representaron dos tercios del total mundial: India (26%), Indonesia (8.5%), China (8.4%), Filipinas (6,0%), Pakistán (5,7%), Nigeria (4,4%), Bangladesh (3,6%) y Sudáfrica (3,6%) (figura1). Estimándose mayor proporción de casos de coinfección de tuberculosis con VIH positivo en los países de la Region de África, superando el 50% en partes del sur de África (21). A nivel mundial, la incidencia de TB expresada por 100 personas-año con VIH fue del 2,1% (rango, 1,9–2,4%), con un riesgo 18 veces mayor de desarrollar tuberculosis en personas con VIH (51).



*Imagen 1. Países que tuvieron al menos 100 000 casos incidentes de tuberculosis en 2019. Los ocho países que presentan el mayor número de casos, y que representaron dos tercios de los casos mundiales en 2019, están etiquetados en el mapa (21).*

El principal organismo causante de la tuberculosis humana es *Mycobacterium tuberculosis*, un patógeno obligado que es miembro del complejo *M. tuberculosis* (MTBC), un grupo de organismos estrechamente relacionados que infectan a diferentes huéspedes animales. La tuberculosis puede afectar a todos los órganos del cuerpo, pero se suele presentar normalmente como enfermedad pulmonar. La transmisión se

produce a través de aerosoles infecciosos liberados de los pulmones de una persona contagiada, por contacto directo en casos de escrófula (tuberculosis cutánea), así como mediante la ingestión de leche o comida de un animal infectado con *Mycobacterium bovis* u otros miembros del MTBC. Sin embargo, la subsiguiente transmisión de estos linajes animales MTBC de persona a persona es raro.

Al haber varios factores que influyen la susceptibilidad a la infección es necesario que se produzca la convivencia con un enfermo tuberculoso para que se transmita. Es por esto que las condiciones socio-sanitarias juegan un papel fundamental en la propagación de la enfermedad. Poblaciones de alta densidad, en espacios pequeños y pobremente ventilados son donde más se produce la transmisión de la infección.

Al ser *M. tuberculosis* un patógeno intracelular obligado es capaz de producir infecciones de por vida. El mantenimiento de la infección persistente sin progresión de la enfermedad supone un delicado equilibrio entre el crecimiento de la bacteria y la regulación inmunológica. En condiciones normales el bacilo alcanza los alveolos donde son digeridos por los macrófagos alveolares, pero a diferencia del resto de bacterias que son fagocitadas, la tuberculosis impide la fusión del fagosoma con los lisosomas (al inhibir la molécula de unión específica, el autoantígeno endosómico temprano 1), permitiendo su persistencia y replicación en el interior de los mismo. Sin embargo, en respuesta a la infección por *M. tuberculosis*, los macrófagos secretan interleucina 12 y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) que atraen linfocitos T y células citolíticas naturales (NK) hacia las zonas de los macrófagos infectados. Este proceso inflamatorio lleva a la diferenciación de los linfocitos T en linfocitos TH1 (linfocitos T cooperadores) con la consiguiente secreción de interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) que activa a los macrófagos infectados favoreciendo la fusión de fagosomas y lisosomas para la destrucción intracelular. Es por ello que personas con una producción disminuida de IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  o que sufren defectos en los receptores para estas citocinas tienen un mayor riesgo de sufrir infecciones graves por micobacterias (9).

Cuando la respuesta inmune es apropiada los macrófagos alveolares, las células epitelioides y las células gigantes de Langhans junto con las micobacterias intracelulares forman el granuloma, que impide la diseminación posterior de las bacterias. Sin embargo, si hay muchas bacterias, los grandes granulomas necróticos o caseosos se encapsulan con la fibrina protegiendo de modo eficaz a las bacterias de la destrucción por los macrófagos. Es por ello que la primoinfección tuberculosa suele ser asintomática, presentando síntomas de tuberculosis primaria en un 5% de los casos. Por lo general permanecen latentes y se suelen reactivar cuando disminuye la respuesta inmunitaria del paciente como consecuencia de la edad, desnutrición, diabetes, alcoholismo, silicosis, gastrectomía o inmunosupresión. Existe un aumento del riesgo de tuberculosis primaria activa en individuos infectados por VIH, además de existir un incremento de la aparición de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a fármacos en esta población (3).

Las micobacterias *M. tuberculosis* y otras especies del complejo *M. tuberculosis* se clasifican dentro de un mismo grupo debido a su crecimiento lento y la ausencia de pigmentación de las colonias. De tal modo que se diferencian de las otras micobacterias, denominadas «micobacterias no tuberculosas» o MNT, por su crecimiento rápido y pigmentación debido a la producción de carotenoides intensamente amarillos que se

pueden estimular por la exposición a la luz (organismos fotocromógenos) o por producirse en ausencia de luz (organismos escotocromógenos). De tal modo que la clasificación de Runyon de las MNT está formada por cuatro grupos: fotocromógenos de crecimiento lento (p. ej., *M. kansasii*, *M. marinum*); escotocromógenos de crecimiento lento (p. ej., *M. gordonae*, que es un microorganismo no patógeno que se aísla con frecuencia); micobacterias no pigmentadas de crecimiento lento (p. ej., *M. avium*, *M. intracellulare*) y micobacterias de crecimiento rápido (p. ej., *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. mucogenicum*). (9) (tabla 1)

Microorganismo	Patogenicidad	Frecuencia en EEUU
<b>COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</b>		
<i>M. tuberculosis</i>	Patógeno estricto	Frecuente
<i>M. leprae</i>	Patógeno estricto	Infrecuente
<i>M. africanum</i>	Patógeno estricto	Rara
<i>M. bovis</i>	Patógeno estricto	Rara
<i>M. bovis</i> (cepa del bacilo de Calmette-Guérin)	Patógeno ocasional	

<b>MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS DE CRECIMIENTO LENTO</b>		
<i>M. Kansai</i>	Generalmente patógeno	Frecuente
<i>M. marinum</i>	Generalmente patógeno	Infrecuente
<i>M. simiae</i>	Generalmente patógeno	Infrecuente
<i>M. szulgai</i>	Generalmente patógeno	Infrecuente
<i>M. genavense</i>	Generalmente patógeno	Infrecuente
<i>M. haemophilum</i>	Generalmente patógeno	Infrecuente
<i>M. malmoense</i>	Generalmente patógeno	Infrecuente
<i>M. ulcerans</i>	Generalmente patógeno	Infrecuente
<i>M. scrofulaceum</i>	Patógeno ocasional	Infrecuente
<i>M. xenopi</i>	Patógeno ocasional	Infrecuente

## MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS DE CRECIMIENTO RÁPIDO

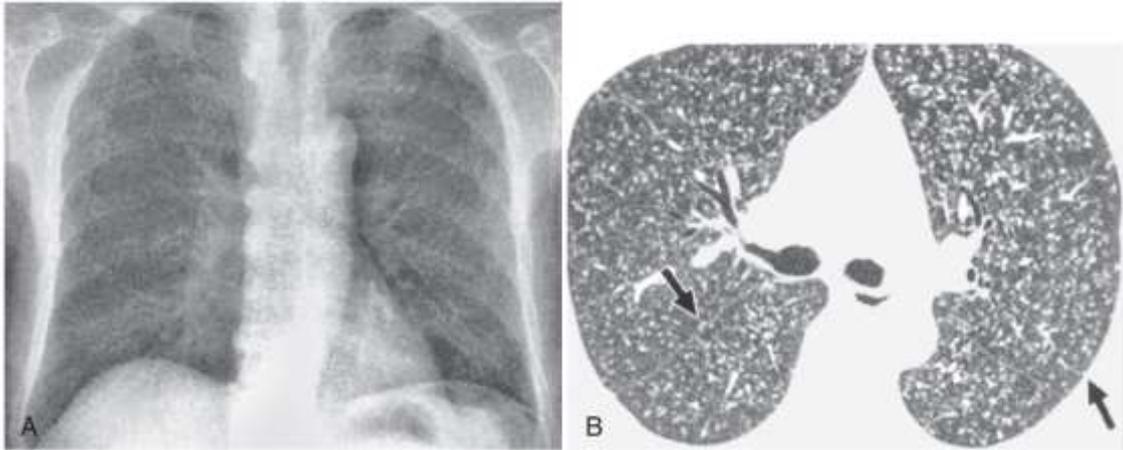
M. abscessus	Patógeno ocasional	Frecuente
M. chelonae	Patógeno ocasional	Frecuente
M. fortuitum	Patógeno ocasional	Frecuente
M. mucogenicum	Patógeno ocasional	Frecuente

*Tabla 1. clasificación de las cepas mycobacterias patógenas para el ser humano según pertenezcan al MTBC (crecimiento lento al que pertenece M. tuberculosis) o al grupo de MNT (crecimiento lento o rápido), y su frecuencia en EEUU. (9)*

La primoinfección tuberculosa (por el agente infeccioso *M. tuberculosis*) suele ser asintomática. Las formas más frecuente de presentación a nivel radiológico es un infiltrado lobular o segmentario acompañado de adenopatías hiliares que se autolimita en el que el 95% de los casos dejando un granuloma calcificado. Por lo que se puede realizar un diagnóstico retrospectivo de infección primaria en forma de una lesión pulmonar periférica calcificada (restos de una cicatriz parenquimatosa) en los campos medio pulmonares (complejo de Ghon), que en ocasiones suele ir acompañada de ganglios hiliares calcificados (complejo de Ranke). (10)

Durante la primoinfección se puede producir un derrame pleural de tipo exudativo, brusco y unilateral. Característicamente no suele acompañarse de lesión pulmonar subpleural, por lo que se cree que se deba a una reacción de hipersensibilidad a la proteína tuberculosa en el espacio pleural. En el exudado se objetiva una predominancia de linfocitos (aunque en estadios iniciales puede haber un predominio de neutrófilos), con glucosa baja debido al consumo por el bacilo, con pH inferior a 7.2, y característicamente los niveles de ADA (adenosín desaminasa) son superiores a 40 UI/litro. Aunque el exudado pueda proporcionar una orientación diagnóstica hacia derrame tuberculoso, es imprescindible la realización de una biopsia pleural con aguja para cultivo dado que no se puede aislar el bacilo en el líquido pleural

La progresión a enfermedad clínica durante la primoinfección es infrecuente, y suele darse sobretodo en niños e inmunodeprimidos. En estos casos, debido a que el sistema inmune no logra contener al bacilo, éste se disemina por vía hematogena a través de los vasos pulmonares originando una tuberculosis miliar. Aunque también puede ser la manifestación de una reactivación tuberculosa con diseminación hematogena. A nivel radiológico se aprecia un patrón miliar o en «grano de mijo» característico. (imagen 2).



*Imagen 2. Tuberculosis miliar en un hombre de 70 años de edad. A. Radiografía AP de tórax que muestra un patrón micronodular en ambos campos pulmonares. B. TAC (sección de 1 mm de grosor) a nivel del bronquio lobular superior derecho que muestra unos nódulos pequeños uniformes distribuidos de modo aleatorio por ambos pulmones. Las flechas señalan los nódulos subpleurales y subfisurales. (11)*

La enfermedad tuberculosa se presenta como un cuadro subagudo de varias semanas de duración que cursa tos, expectoración en ocasiones hemoptoica, dolor torácico o síntomas generales (febrícula o fiebre, sudoración, astenia, anorexia o pérdida de peso). En la radiografía se puede observar un infiltrado infraclavicular con broncograma aéreo y tendencia a la cavitación. (imagen 3)



*Imagen 3. Radiografía de tórax de un enfermo con una tuberculosis pulmonar en la que se observa una gran cavitación en el vértice pulmonar derecho. (10)*

La forma adenopática o ganglionar es la forma más frecuente de presentación extrapulmonar de la tuberculosis. Es muy típica en la infancia y en VIH.

La enfermedad de tuberculosis bovina (resultante de la infección por *M. bovis*) suele afectar más al ganado y a otros mamíferos. Cuando se transmite a los humanos se convierte en tuberculosis zoonótica. La incidencia de tuberculosis zoonótica ha ido disminuyendo gracias al control del ganado y la pasteurización de la leche de vaca (la principal vía de transmisión es la ingesta de leche y productos lácteos no pasteurizados) o mediante la exposición ocupacional de los trabajadores del ganado puede ocurrir por inhalación de aerosol del ganado infectado.

Tiene una afectación clínica extensa que puede ser mortal y está presente principalmente en África (causando aproximadamente el 3% de todos los casos de tuberculosis pulmonar) y el sureste de Asia. Es frecuente que la presentación clínica de la tuberculosis bovina (causada por *M. bovis* en humanos) sea muy similar a la tuberculosis humana (resultante de la infección por *M. tuberculosis*). Se estima que en algunos países un 10% de los casos de tuberculosis declarados son por *M. bovis*. Dato que hay que tener en consideración pero contextualizar según los países donde nos encontremos, debido a que en algunos países existe una elevada prevalencia de tuberculosis y de la coinfección de VIH, además del modo de vida que tienen en contacto directo con ganado como en África subsahariana (21,50).

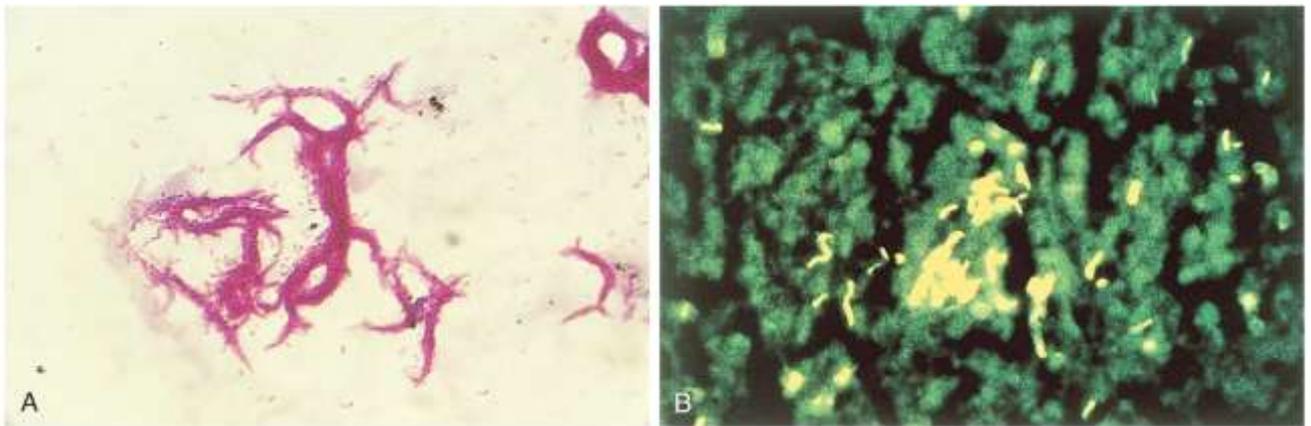
El diagnóstico clínico se apoya en pruebas radiológicas, Mantoux positivo y la detección en el laboratorio de micobacterias al microscopio o en cultivo. Es necesario para ello recoger para ello al menos tres primeras muestras respiratorias de la mañana durante tres días consecutivos cuando se sospeche de afectación pulmonar. En el caso de pacientes con enfermedad diseminada (p. ej., aparato genitourinario, tejidos, líquido cefalorraquídeo) o con otras micobacterias, es necesario recoger un mayor número de muestras para cultivo y con la mayor cantidad de líquido o tejidos posible.

La **prueba cutánea de la tuberculina o Mantoux** permite la identificación de pacientes infectados por micobacterias mediante la inyección intradérmica de antígenos micobacterianos (PPD) y medición de la induración intradérmica a las 48 horas. Existen pacientes con anergia cutánea (arreactivos frente a los antígenos) debido a inmunodepresión, sarcoidosis o SIDA. Del mismo modo se puede obtener falsos positivos en aquellos pacientes que recibieron la vacuna BCG o bacilo de Calmette-Guérin con *M. bovis* atenuado (**bacilo de Calmette-Guérin [BCG]**). (9)

Las **pruebas de liberación *in vitro* de IFN- $\gamma$**  son una alternativa a la prueba cutánea con PPD más sensible y específica dado que usan antígenos específicos de *M. tuberculosis*, lo que permite diferenciar si un individuo está infectado por *M. tuberculosis* de otras micobacterias, evitando falsos positivos como aquellos que recibieron la vacunación con la BCG.

La detección microscópica de bacilos ácido-alcohol resistentes en las muestras clínicas obtenidas por distintos métodos (esputo, orina, biopsia directa, exudados, BAL,...) es un método rápido para confirmar una enfermedad por micobacterias. La muestra clínica se tiñe con carbolfucsina (métodos de **Ziehl-Neelsen** o de **Kinyoun**) o con colorantes

fluorescentes de auramina-rodamina (método del **fluorocromo de Truant** ), se decolora con una solución de ácido-alcohol y a continuación se aplica una tinción de contraste. (Imagen 4)

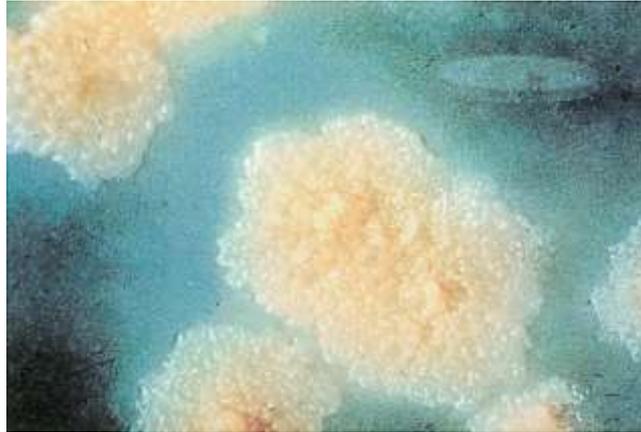


*Imagen 4. Tinciones ácido-alcohol resistentes de Mycobacterium tuberculosis . (A) Teñida con carbolfucsina usando el método Kinyoun. (B) Teñidas con los colorantes fluorescentes auramina y rodamina usando el método fluorocromo de Truant. (9)*

A pesar del excelente rendimiento de la tinción de Ziehl-Neelsen, junto con la radiografía de torax sólo se consigue diagnosticar el 10% al 30% de los casos de tuberculosis. Es por esto que el diagnóstico se debe confirmar mediante cultivo en medio sólidos o líquido (por ejemplo, medio Löwenstein-Jensen o agar solido durante 8 semanas).

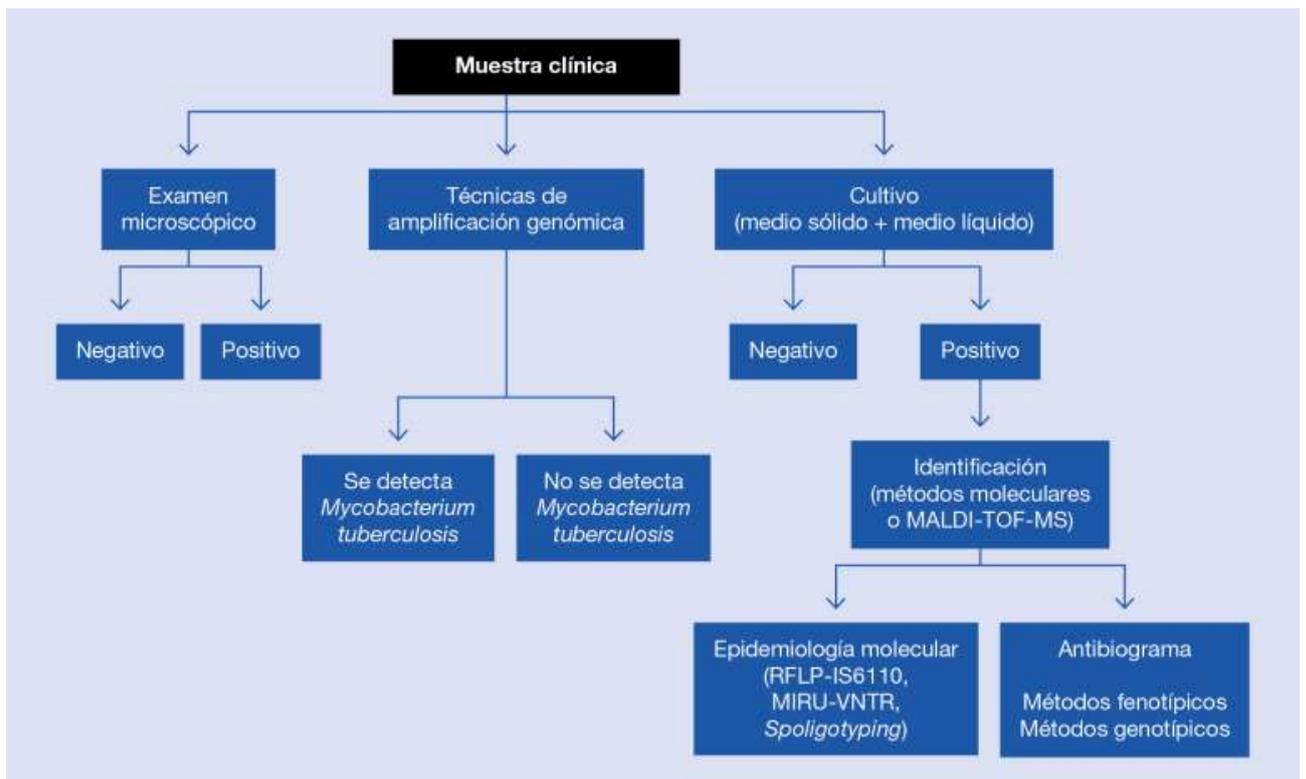
La proliferación *in vitro* de las micobacterias se complica por el hecho de que la mayoría de las cepas crece lentamente y se pueden ver ensombrecidas por las bacterias de crecimiento rápido que normalmente colonizan al ser humano. Por tanto, algunas muestras, como las de esputo, se tratan inicialmente con **reactivos descontaminantes** (p. ej., hidróxido de sodio al 2%) con el fin de eliminar los microorganismos que pueden dar lugar a resultados confusos. Las micobacterias pueden tolerar tratamientos alcalinos de corta duración que destruyen las bacterias de crecimiento rápido y permiten el aislamiento selectivo de las micobacterias. La descontaminación extensa de la muestra elimina a las micobacterias, por lo que este método no se lleva a cabo cuando se analizan muestras que normalmente son estériles o se espera la presencia de un reducido número de micobacterias.

Las muestras inoculadas en medios con huevo (p. ej., **Löwenstein-Jensen** ) y con agar (p. ej., **Middlebrook** ), suelen requerir 4 semanas o más para la detección de *M. tuberculosis* (Imagen 5). Sin embargo, este período se ha acortado en aproximadamente 2 semanas como consecuencia de la introducción del uso de **caldos de cultivo** especiales que facilitan el desarrollo rápido de la mayoría de las micobacterias. La capacidad de *M. tuberculosis* de crecer rápidamente en caldos de cultivo específicos se ha empleado también para la realización de pruebas de sensibilidad rápidas.



*Imagen 5. Colonias de Mycobacterium tuberculosis en agar de Löwenstein-Jensen después de 8 semanas de incubación. (12)*

El retardo diagnóstico en espera del resultado del cultivo ha llevado a la necesidad de desarrollar nuevos marcadores moleculares para el diagnóstico temprano de *M. tuberculosis* a partir de material genético, tales como la PCR (Xpert), MIRU-VNTR, RFLP, etc. Estos métodos pueden ser aplicados también en Paleomicrobiología para el estudio de la historia de la tuberculosis y su relación con los humanos. (Imagen 6)



*Imagen 6. Algoritmo para el diagnóstico microbiológico de la tuberculosis. ADN, ácido desoxirribonucleico; MALDI-TOF-MS, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; MIRU-VNTR, mycobacterial interspersed repetitive units-variable.*

## **Parte II: IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE MUESTRAS TB EN LA HISTORIA**

En un principio el estudio de la Paleomicrobiología estaba ligado al estudio paleopatológico llevado a cabo sobre lesiones orgánicas en cadáveres. Las lesiones más accesibles y patognomónicas de tuberculosis son cambios esqueléticos visibles como el colapso de las vértebras en la enfermedad de Pott, así como lesiones reactivas periólicas en los huesos tubulares, osteoartropatía hipertrófica y osteomielitis. Pero las lesiones óseas ocurren tan sólo en el 3-6% de los casos de tuberculosis histórica, dado que el principal sitio de afectación es pulmonar y pleural. Otra fuente de tuberculosis histórica es el tejido momificado; sobretodo de momias naturales como las encontradas en la cripta de una iglesia sellada en V aC, en Hungría (13); o un caso del siglo XVII en una momia coreana (5) que permitieron el diagnóstico basándose únicamente en la histología y microscopía. Este tipo de muestras altamente conservadas son, sin embargo, muy poco frecuentes. Es por ello que la mayor parte de los métodos de estudio actuales se centran en técnicas moleculares.

Es conveniente recordar que el género *Mycobacterium* abarca más de 120 especies diferentes, todas con similar aspecto al microscopio y de las que más de la mitad, tanto saprófitas como patógenas, pueden obtenerse a partir de muestras procedentes de seres humanos. De tal modo que las nuevas técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y la espectrometría de masas (MALDI-TOF-MS, del inglés *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass*) no sólo han agilizado la identificación de las diferentes especies, sino que han permitido el diagnóstico de infección tuberculosa sin requerir la presencia de lesiones orgánicas visibles (imagen 6). Todo ello supone una visión mucho más retrospectiva de la tuberculosis entendida como enfermedad y como simbionte de los humanos.

Los métodos de laboratorio más empleados en el estudio paleomicrobiológico de la tuberculosis son:

### **1. Identificación tuberculosis mediante RFLPs visualizados en electroforesis en gel**

Los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs) son un tipo de polimorfismo derivados de la variación en la secuencia de ADN reconocida por las enzimas de restricción (13, 15). A lo largo de una secuencia de ADN, existen locus particulares, de entre cuatro a ocho ácidos nucleicos, donde la enzima de restricción puede unirse y cortar el ADN. Un locus (singular) o loci (plural) es el lugar del genoma en el que se encuentra localizado el gen (14).

De este modo se pueden demostrar diferencias genéticas entre individuos o cepas a partir de la presencia o no de una secuencia, es decir de un polimorfismo. En el estudio de *M. tuberculosis*, uno de los fragmentos polimórficos más utilizados es la secuencia IS6100. Esta secuencia permite tipificar *M. tuberculosis* para realizar estudios epidemiológicos y segregar los grupos de cepas estrechamente relacionadas (13).

Uno de los inconvenientes es que la diferenciación de cepas depende en gran medida del número de copias de IS6100, por tanto las cepas con un alto número de copias se

diferencian con precisión de sus variantes cercanas, mientras que las cepas con pocas copias son más difíciles de segregar. Otra limitación del RFLP es que requiere una gran cantidad de material genético. En muestras actuales este material se obtiene tras realizar un cultivo de micobacterias, con una duración de 20 a 40 días. En muestras históricas es mucho más complicado obtener suficiente cantidad de material genético para realizar este tipo de análisis debido a las limitaciones ya mencionadas anteriormente.

## **2. Amplificación de ADN por PCR**

Una solución a la limitación en la cantidad de ADN es la amplificación del mismo mediante PCR. A partir del uso de la PCR se amplificaron secuencias específicas del ADN de MTBC, mediante el uso de cebadores que permite seleccionar la parte del genoma a amplificar. Con esta técnica se pueden producir un billón de copias de la secuencia en estudio en sólo unas pocas horas. Esto permite una tipificación rápida, reproducible y eficiente de las bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* a partir de muestras de ADN.

El método general basado en PCR se denomina PCR "spoligotyping" (1, 5, 13, 15). Consiste en la amplificación selectiva de ciertas regiones variables del genoma de MTBC. Las regiones diana más empleadas para el análisis de PCR son la región repetida directa (DR) así como las secuencias de inserción IS6110 e IS1081, que pueden estar presentes en número variable en el genoma.. Por tanto las cepas de *M. tuberculosis* se pueden discriminar según su número de locus DR y la presencia o ausencia de espaciadores particulares.

## **3. El análisis MIRU-VNTR (Unidad repetitiva de identificación de micobacterias-VNTR).**

Se basa en el análisis de 24 loci VNTR específicos para *Mycobacterium tuberculosis*. Los loci de VNTR diana se amplifican mediante PCR con un conjunto de cebadores específicos para las regiones limitantes de cada locus con la posterior determinación del aplicón mediante electroforesis en gel (13, 15). En estas secuencias solo se producen polimorfismos menores, que siguen el modelo de mutación escalonada. Esto significa que el estado alélico cambia por la adquisición o pérdida de una unidad repetitiva.

El SMM o el modelo de mutación escalonada (Stepwise Mutation Model) es una teoría matemática que nos permite derivar una fórmula para la distribución de equilibrio de frecuencias alélicas en una población finita cuando se producen alelos selectivamente neutrales de manera escalonada (16). La diferencia con el modelo convencional de distribución neutral de alelos infinitos (modelo de Kimura-Crow) es que, a medida que el tamaño de la población aumenta indefinidamente, el producto del tamaño efectivo de la población y la tasa de mutación se mantiene en un valor fijo. Es decir, el número medio de alelos diferentes contenidos en la población alcanza rápidamente una meseta que no es mucho mayor que el número efectivo de alelos (recíproco de homocigosidad). Las diferencias en la longitud de "repeticiones de secuencia simple" (SSR) entre individuos pueden ser utilizados para establecer relaciones filogenéticas o determinar la distancia genética entre grupos de individuos. El SMM tiene en cuenta el límite de

tamaño superior a la mayoría de los microsatélites, así como la probabilidad de que los alelos grandes muestren tasas más altas de mutación que los alelos pequeños.

La varianza en los tamaños de los alelos sirve para hacer inferencias sobre la distancia genética entre individuos o poblaciones. Esto permite que se puedan hacer inferencias sobre las historias de la población mediante la comparación estadística.

#### **4. PCR tiempo real**

La PCR cuantitativa o a tiempo es la amplificación de ADN que se realiza generalmente en muestras de muestras antiguas, dado que permite cuantificar la muestra y además utiliza regiones diana más cortas, que se corresponden mejor con el ADN fragmentado que se encuentran a menudo en materiales antiguos. Se pueden obtener buenos resultados utilizando regiones diana entre 70 y 110 pares de bases (pb). Posteriormente, los productos de PCR se secuencian y examinan en busca de polimorfismos específicos para permitir la genotipificación y subgenotipificación.

Los análisis genómicos que se realizaron sugerían que *M. tuberculosis* evolucionó a partir de un grupo de micobacterias conocidas como *Mycobacterium canetti* que adquirieron virulencia y persistieron gracias a la pérdida de función genética, y la adquisición de nuevos genes. La definición de su parentesco en base a polimorfismos de secuencia reveló que los miembros individuales del MTBC (excluyendo *Mycobacterium canettii*) eran idénticos en un 99,95% sobre la base de la secuencia de nucleótidos; lo cual sugiere que hubo una evolución en cuello de botella en el momento de la especiación (1). La fecha estimada de este evento varía desde hace 3 millones de años (si se incluye *M. canetti*) a tan solo 40.000 años. Esto implica que dependiendo del análisis se postula un origen antiguo del complejo MTBC, o uno más reciente que coincide con el desarrollo de la agricultura y la revolución neolítica. Gran parte del estudio paleomicrobiológico actual se centra en discriminar cuál de estas hipótesis (origen reciente vs origen antiguo) explica mejor la evolución de MTBC.

Un locus importante que se analiza habitualmente mediante PCR y PCR a tiempo real corresponde a una delección en la región TdD1, detectada mediante secuenciación de los genomas de distintas cepas del MTBC D1 (1, 5, 7, 17). Esta delección, que más adelante explicaremos con más detalle, permite distinguir las “cepas modernas” de las “cepas antiguas”, permitiendo separar el clado al que pertenece *M. Bovis* del clado al que pertenece *M. tuberculosis*.

#### **5. Biomarcadores de lípidos de la pared celular**

*M. tuberculosis* tiene una envoltura celular que incorpora un arabinogalactano ligado a un peptidoglicano esterificado por ácidos micólicos de cadena larga. La distribución de estos lípidos varía entre las micobacterias y por tanto pueden actuar como biomarcadores específicos en la identificación de *M. tuberculosis*. La ventaja de los biomarcadores de lípidos es que se detectan mediante métodos extremadamente sensibles como espectrometría de masas (HPLC), por lo que no hay amplificación del material. La gama de biomarcadores ahora incluye ácidos micocerosicos y multimetil-micolipénicos ramificados (1).

Los lípidos de la pared celular de las micobacterias son muy estables pudiendo persistir durante miles de años permitiendo detectar con elevada sensibilidad entre distintas micobacterias (tuberculosis y lepra). También puede detectar coinfecciones, incluso cuando se encuentran en la misma muestra debido a una infección mixta y, a veces, en muestras sin ADN antiguo detectable, permitiendo el conocimiento de infecciones micobacterianas pasadas mucho más allá del rango del ADN microbiano antiguo.

## **6. Detección de antígenos y anticuerpos**

Los antígenos de carbohidratos o proteínas son moléculas que pueden inducir la producción de anticuerpos, por lo que se pueden utilizar para detectar organismos infecciosos. Suelen ser más estables que los ácidos nucleicos, pero aun así, los determinantes antigénicos en tejidos antiguos suelen dañarse o destruirse, lo que limita su uso. Los anticuerpos específicos frente a la bacteria también se pueden detectar en tejidos momificados mediante el inmunoelectrotransferencia blot, pero generalmente son menos estables y mucho más difíciles de detectar que los propios antígenos (1).

## **7. Next Generation Sequencing (NGS)**

El genoma de MTB se secuenció por primera vez en 1998 a partir de la cepa H37Rv y comprende alrededor de 4,4 millones de pares de bases y codifica para alrededor de 4000 genes (1). La NGS ha permitido la secuenciación del genoma bacteriano completo en un período de tiempo corto (horas-días) y sin necesidad de cultivo a partir del esputo directo, permitiendo identificar la coinfección de múltiples cepas dentro de un mismo individuo, así como información epidemiológica sobre las cepas circulantes, la farmacorresistencia y definir la dinámica de transmisión. Actualmente los líderes del mercado de NGS son Illumina que ofrecen datos de secuencia de lectura corta de alta precisión, y PacBio (17) que proporciona una secuencia de lectura larga utilizados ampliamente para la investigación microbiológica. Mediante la secuenciación del genoma y la WGS se han establecido perfiles de genotipo-fenotipo que permiten predecir la resistencia y la susceptibilidad a fármacos en MTB. Para establecer un consenso se han creado varias bases de datos que contiene información sobre mutaciones que confieren resistencia a los fármacos, como TBDRandomDB y MUBII-TB-DB (15). Su aplicación en enfermedades infecciosas permite la identificación de especies, la secuenciación de brotes y la tipificación para la vigilancia epidemiológica mundial de la enfermedad. Aunque los métodos NGS también pueden ser utilizados en el análisis de ADN antiguo, la gran fragmentación de este hace muy difícil obtener genomas completos a partir de muestras históricas. No obstante las técnicas de NGS acopladas a la amplificación de ciertos fragmentos (metabarcoding) permiten utilizar la potencia de la secuenciación masiva acoplada a la amplificación de ADN. La secuenciación del genoma, aunque sea parcial, permite el análisis de polimorfismos (SNPs) que permiten el trazado de la filogenia de los distintos linajes. Actualmente es una herramienta muy utilizada en paleomicrobiología.

### **Parte III: LA CUESTIÓN DEL ORIGEN DE LA TUBERCULOSIS**

Para entender los orígenes y evolución de la tuberculosis es importante recordar que el complejo MTB no sólo lo compone de *M. tuberculosis* (patógeno humano), sino que contiene otras especies asociadas con infecciones humanas, incluida *Mycobacterium africanum* (aislado en poblaciones africanas) y cepas estrechamente relacionadas encontradas en infecciones animales que pueden infectar a humanos, como *Mycobacterium bovis* (ganado), *Mycobacterium capri* (cabras), *Mycobacterium microti* (roedores) y *Mycobacterium pinnipedii* (focas).

Además, existe la cepa de *Mycobacterium canetti* localizada en el Cuerno de África que se considera la cepa ancestral de los otros miembros del complejo MTB. Los restos arqueológicos más antiguos localizados en el Alto Egipto, cerca de la ciudad de Nagada, muestran la presencia de tuberculosis durante el periodo predinástico 4500 -3000a.C (7). Enfermedades compatibles con la tuberculosis son referidas en textos médicos anteriores a la dinastía Xia en China y en los Vedas indios, datados hace unos 5.700 y 3.500 años respectivamente (7).

En Europa se ha llegado a datar los primeros casos de espondilitis tuberculosa (enfermedad de Pott) en restos del Neolítico temprano (1,5,7). Estos restos se han asignado a la cultura de la cerámica lineal, datada hace 5400-4800 a. C. en tres yacimientos (Halberstadt, Derenburg y Karsdorf) de Sajonia-Anhalt en el centro de Alemania (7). Existen también otros casos con evidencias morfológicas de tuberculosis que además se confirmaron mediante análisis de biomarcadores de lípidos y análisis de ADN antiguo. Estos restos, obtenidos en distintos yacimientos europeos, datan del 5000 a. C., lo cual atestigua la difusión de la infección en diferentes áreas de Europa. Se demostró también una concentración particular de TB en el área de Finalese en Liguria (noroeste de Italia) perteneciente al período Neolítico Medio (4000-3500 aC), donde se descubrieron tres casos en tres cuevas importantes que se encuentran muy próximas entre sí: Arene Candide, Arma dell'Aquila y Cuevas de Pollera (7).

Fuera del escenario europeo, se observó un posible caso neolítico de tuberculosis en un individuo adulto de Shanghai, China, asociado con la cultura Songze (3900-3200 aC), al comienzo de la agricultura del arroz húmedo (7). Es decir aunque la datación exacta del origen de la tuberculosis humana no es clara y varía según la localización geográfica; sí que se observa un claro incremento de la evidencia de paleopatología de tuberculosis a partir del Neolítico tardío. Esto ha llevado a la conjetura sobre el origen y la datación de la adquisición de la tuberculosis humana y su relación evolutiva con el complejo MTB.

#### **1. El salto de la paleopatología tuberculosa a las técnicas de secuenciación modernas ¿Es la tuberculosis una zoonosis?**

Con el surgimiento de nuevas técnicas de identificación de tuberculosis se ha podido identificar la tuberculosis antigua en restos arqueológicos sin patología orgánica visible, llegando incluso a identificación de la coexistencia de varias cepas pertenecientes al complejo MTB. Un claro ejemplo es una momia egipcia del 600 a.C, analizada mediante la detección de marcadores de lípidos de la pared celular y del ADN antiguo (5). Estas técnicas revelaron que además de *M. tuberculosis* (sensu stricto) los humanos

mantienen otras especies asociadas con infecciones humanas, incluyendo *Mycobacterium africanum* y cepas estrechamente relacionadas. Algunas de estas cepas fueron encontradas también en animales infectados, que podrían haber actuado como vectores de transmisión hacia los seres humanos. Uno de los principales objetivos de los análisis genómicos e históricos de los patógenos es la reconstrucción de la escala de tiempo de su aparición y propagación. Muchos patógenos infectan a humanos al cruzar a través de una barrera de especies de animales (zoonosis); aunque la mayoría de estos saltos dan como resultado emergencias y extinciones sin salida. Sin embargo, ocasionalmente, los patógenos emergentes establecen ciclos de transmisión sostenidos. De hecho, se estima que 140 000 (rango, 69 800-235 000) de los nuevos casos de tuberculosis a nivel mundial en 2019 eran por zoonosis, sobre todo por *Mycobacterium bovis* (21,45).

Estas hipótesis volvieron a sacar a la luz la cuestión que muchos investigadores ya se hicieron al analizar los primeros restos paleopatológicos, ¿las cepas animales precedieron a la humana? ¿Fueron los primeros casos de tuberculosis debidas a zoonosis por *Mycobacterium bovis*?

Las teorías anteriores al desarrollo de los estudios biomoleculares, postulaban que los seres humanos adquirieron MTB del ganado (*M.bovis*) durante la revolución neolítica debido a la transferencia zoonótica de los animales recién domesticados y se propagó con éxito en las poblaciones de *H. sapiens*. Según esta hipótesis, después de algunos milenios de coevolución, la bacteria especializada en su nuevo huésped, se convertiría en humano específico (la cepa ahora conocida como *M. tuberculosis*). De hecho, hasta ahora no se ha encontrado ningún resto humano de más de 11.000 años de antigüedad con rastros de enfermedad tuberculosa, mientras que sí que se ha encontrado enfermedad tuberculosa en un bisonte Pleistoceno extinto fechado por radiocarbono de 17.000 años (*Bison antiquus*). (5,7)

El hallazgo de este bisonte del Pleistoceno, encontrado en una trampa natural creada en una cueva en Ohio (EE. UU) para la caza, ayudó a especular sobre la adquisición de los primeros casos de tuberculosis en humanos mediante la caza, despellejar y pulir huesos (5). Este fósil documenta que la tuberculosis estaba presente en América del Norte al menos 20000 años antes de la domesticación. Sin embargo se demostró que la cepa encontrada en los restos del bisonte era más similar a *M. tuberculosis* o *M. africanum* que a *M. bovis*.

Lo curioso es que *M. africanum* se ha detectado en restos humanos junto con *M. tuberculosis* en el antiguo Egipto, durante el período del Reino Medio en Tebas, hallazgos que fueron confirmados por tipificación molecular (1, 5). Sin embargo el DNA de *M. bovis* en humanos se ha detectado sólo en un pequeño grupo de pastores de la Edad del Hierro en el sur de Siberia que hibernaban con sus animales, cuya datación por radiocarbono arrojó fechas de 1761 a 2199 años a.C. (5). Por ende y gracias a la tipificación de espoligotipos se pudo diferenciar a las cepas de MTBC de otras micobacterias ambientales y separar claramente *M. bovis* de *M. tuberculosis* mediante la detección de la presencia o ausencia de la secuencia DR (1, 5, 15). La secuenciación del genoma completo (WGS) también confirmó que *M. tuberculosis* no evolucionó de *M. bovis*, sino que su historia evolutiva es compleja, y refleja la propia evolución humana.

Es decir, se conjetura que MTBC ha evolucionado con los humanos durante miles de años, influyendo recíprocamente en su evolución. Según los datos de muestreo y genómica poblacional actualmente disponibles, los linajes animales surgieron de un ancestro común estrechamente relacionado con el linaje 6 (*M. africanum*). Los múltiples saltos de hospedador llevaron a fomentar el tropismo de la tuberculosis al *H. sapiens*. Al ser el *M. tuberculosis* un patógeno obligado sin reservorio ambiental, su persistencia está relacionada con la densidad de la población humana y las diferentes presiones evolutivas. Normalmente, los comensales se transmiten verticalmente de padres a hijos, mientras que los patógenos son transmitidos horizontalmente (31, 34). Sin embargo, la tuberculosis es un caso intermedio, porque en una población de baja densidad las personas tienen más probabilidades de transmitir la infección a los miembros de la familia que a los extraños. Esto explica que durante el período neolítico, con el desarrollo de la agricultura, un aumento en la densidad de población llevara aparejado un aumento de la prevalencia de tuberculosis, que en los enterramientos es hallada principalmente en pequeños grupos familiares. La coexistencia del patógeno y el anfitrión evidencia la relación indirecta que existe entre urbanización y tuberculosis, basándose en la relación entre la resistencia natural humana a la enfermedad y los asentamientos urbanos a largo plazo, que causaron presión de selección sobre la supervivencia en su huésped humano. Con el auge de la transición demográfica neolítica hace  $10000 \pm 2000$  años atrás (7), la tuberculosis aumentó su tasa de difusión junto con el aumento de la densidad de la población humana tras el avance de la agricultura y la domesticación animal. Esto se explica porque a mayor densidad de población menor son las dificultades para la transmisión, y como consecuencia la extensión de la enfermedad es más sencilla, aumentando la posibilidad de padecer múltiples infecciones.

Todo ello sugiere que el éxito demográfico de la tuberculosis durante el período Neolítico se debió más al crecimiento de la densidad y el tamaño de la población humana, que a la generalización de la ganadería. Fue esta alta densidad del huésped lo que favoreció la coexistencia de distintas cepas o parásitos. La coinfección por diferentes cepas o genotipos parasitarios lleva a la competición por los recursos similares del hospedador que hace que la virulencia varíe (Frank 1996). Es decir, la infección causada por una sola cepa de tuberculosis puede desarrollar una baja virulencia maximizando así el tiempo de estancia en el hospedador, debido a que la respuesta inmune generada en el hospedador sería menor. Sin embargo, ante la llegada de una nueva cepa/ genotipo u otro microorganismo, la competencia que se produce entre ambos por los recursos lleva a un aumento del consumo de energía del hospedador utilizada por una cepa que hace que aumente su virulencia y evita que la otra cepa coinfectante persista, ejerciendo así una presión positiva sobre la evolución (34).

Es por ello que la mayor frecuencia de la transmisión de enfermedad activa se asociaba a los extremos de la vida. Se piensa que los ancianos o los grupos más vulnerables sufrían de una infección reemergente y la contagiaban a los lactantes, que tienen un sistema inmunológico inmaduro, causando alta tasa de mortalidad. Por tanto, los nuevos patógenos introducidos por migración o por nacimiento podrían transmitirse décadas después de infectar aun huésped. Esto explica como la transición desde la búsqueda de alimento hasta las comunidades agrícolas asentadas en el período neolítico coincidió con la aparición de enfermedades, asociado con poblaciones más grandes y densas, un estilo

de vida sedentario, domesticación generalizada de animales, estratificación social y una dieta menos variada; pero no por la transferencia zoonótica del ganado.

Además con los datos de muestreo y genómica poblacional actualmente disponibles, se ha observado que los linajes animales emergen de un ancestro común estrechamente relacionado con el linaje 6 (*M. africanum*) que pertenece a otro clado al que pertenece el *M. tuberculosis* humano (Imagen 7).

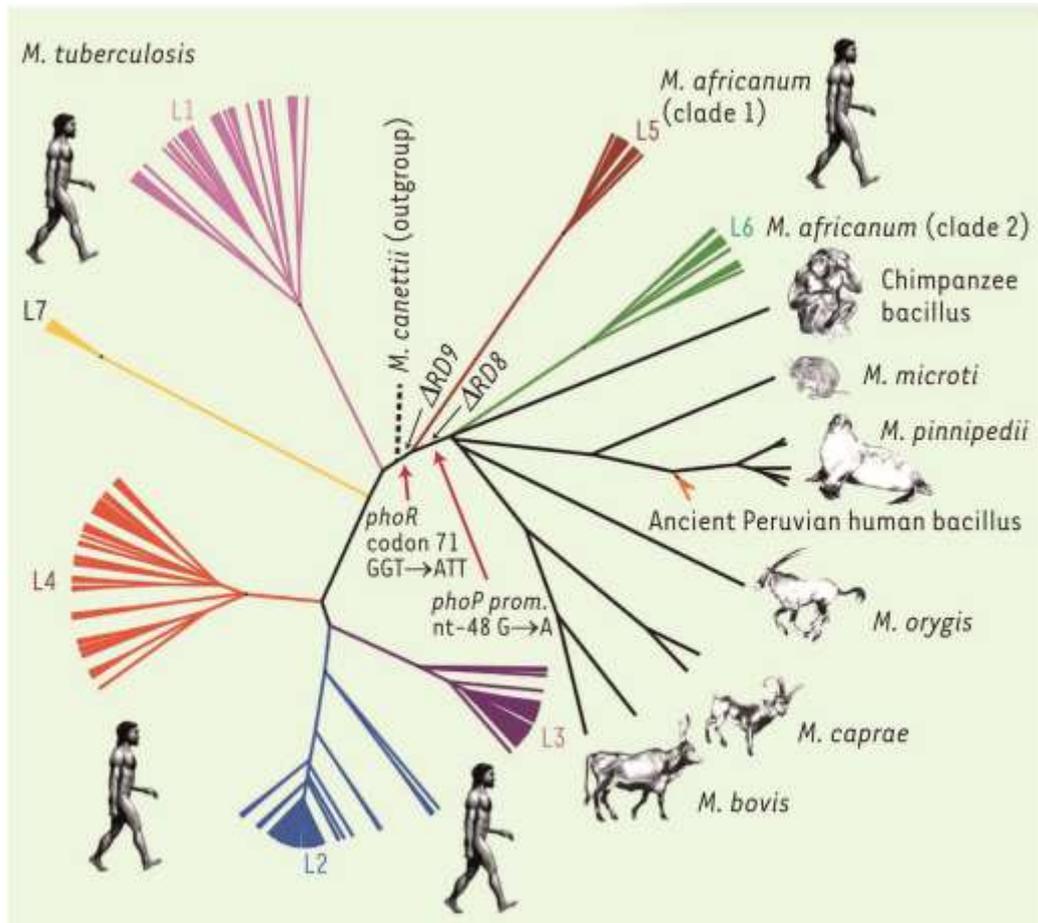


Imagen 7. Representación filogenética de 261 cepas pertenecientes al MTBC. Se indican las deleciones específicas de animales y *M. africanum*. (13)

La revolución neolítica (7) generalmente se refiere a la transición mundial en el estilo de vida y subsistencia de economías más móviles a formas de vida más sedentarias, agrícolas y con economías hechas posibles por la domesticación de plantas y animales. Los hallazgos arqueológicos más antiguos de tuberculosis abarcan el período neolítico anterior a la domesticación de animales, por lo que se han situado la aparición de la tuberculosis en el centro de un conjunto de impactos que tuvieron lugar en la salud humana como consecuencia de los cambios en el estilo de vida del Neolítico, denominados la primera transición epidemiológica. La primera transición epidemiológica (18) se produjo hace 10.000 años debido a un marcado incremento en la prevalencia de enfermedades infecciosas producidos por el aumento de la densidad de la población. La urbanización, la domesticación de animales, el sedentarismo, el

cultivo y la estratificación social crearon un nicho ecológico para las bacterias, así como los piojos transmisores del tifus y las pulgas infestadas con el bacilo de la peste. También las altas densidades de población favorecieron la transmisión respiratoria de la peste y tuberculosis, así como la transmisión de enfermedades virales.

De hecho los primeros restos arqueológicos humanos de tuberculosis constatados mediante biomarcadores de ADN y lípidos estaban ubicados en La Luna Media Fértil y pertenecían al período Neolítico Pre-Cerámico B. Las datación de las lesiones compatibles con tuberculosis en Dja'de el Mughara, situado en el río Éufrates en el norte de Siria, se estiman como antes habíamos comentado en la fase previa a la domesticación (8800-8300 aC), al igual que el individuo de Tell Aswad hallado en el sur de Siria que mostraba lesiones típicas de la osteoartropatía pulmonar hipertrófica (7). Estos hallazgos junto la notificación de otros tres casos de tuberculosis humana esquelética en la aldea neolítica de Ain Ghazal (Jordania) confirmaban la presencia de tuberculosis humana antes y / o durante la introducción de la agricultura y la domesticación de animales (7).

Hay que tener en cuenta que aunque el genoma de referencia más antiguo del que se dispone hasta la fecha para la realización de estudios genéticos corresponde a unos restos encontrados en la aldea levantina de Atlit-Yam, ahora sumergida (Israel), datados con menos de 8500 años de antigüedad (1, 5, 7). Esta fecha corresponde a la última fase del período Neolítico Pre-Cerámica, cuando la transición a la agricultura y la domesticación de animales se había completado. Por lo que fueron los estudios de secuenciación de última generación los que en última instancia pudieron trazar los árboles filogenéticos y separar la cepa *M.tuberculosis* de *M.bovis*, y por tanto, desechar la idea de que la tuberculosis tuviera su origen en una zoonosis, aunque pudieran coincidir ambas micobacterias en los restos históricos.

Aunque *M. tuberculosis* no proceda de la evolución divergente de *M. bovis*, la coinfección de ambos microorganismos justificados por el aumento de los asentos humanos es importante para explicar la evolución de las distintas cepas del complejo MTB. Estudios metagenómicos han constatado la presencia de infecciones mixtas, con varias cepas de MTB. La mayoría de los seres vivos a lo largo de su vida sufren el ataque de algún otro parásito o microorganismo, conocido como hiperparasitismo (relación que tiene lugar entre parásitos que son infectados por otros parásitos Price 1980). La importancia que tienen las enfermedades a nivel evolutivo sobre las poblaciones de hospedadores comenzó a tomar relevancia con Anderson y May 1979 (34). Actualmente se entiende que una virulencia muy alta tiende a erradicar rápidamente la enfermedad, dado que los hospedadores mueren antes de que el microorganismos pueda transmitirse. Pero existen parásitos que tienen una menor virulencia o elevada latencia por lo que permanecen evolutivamente en las poblaciones de hospedador más tiempo como es el caso de la tuberculosis.

Es complicado delimitar las relaciones simbióticas entre organismos que se encuentran estrechamente relacionados entre sí. De hecho existen organismos que dependiendo de las condiciones del hospedador como puede ser su estado inmunológico pueden ser

comensales o parásitos. En general, existe una carrera coevolutiva entre microorganismo y hospedador basada en la selección recíproca. La selección recíproca se basa en que el parásito reduce la esperanza de vida o la fecundidad del hospedador intentando maximizar la explotación del mismo y, a su vez, estos intentan minimizar la pérdida de eficacia biológica causada por el microorganismo (34)

Este fenómeno de presentar cepas mezcladas del MTBC es significativo, y ha sido reconocido recientemente en el África subsahariana moderna. Se ha postulado que debido a la elevada prevalencia endémica de VIH y SIDA en África existe una mayor susceptibilidad de la población local a presentar enfermedad tuberculosa, de tal modo que permitió que la tuberculosis sufriera cambios microevolutivos (5). Es decir, la coinfección de VIH y tuberculosis permitió la evolución local de MTB dentro de estas poblaciones. De hecho, existe un riesgo 18 veces mayor de desarrollar tuberculosis activa en las personas infectadas por VIH frente a las personas VIH- negativas (21). La combinación de la infección por el VIH con la tuberculosis es letal, ya que la una acelera la evolución de la otra. Según datos recogidos por la OMS en la Región de África, donde la carga de tuberculosis asociada al VIH es la más elevada, el 86% de los pacientes con tuberculosis eran VIH positivo. Globalmente, el 88% de los pacientes de tuberculosis con infección conocida por el VIH estaban en tratamiento antirretrovírico en 2019 (21, 51). (figura 2 y 3)

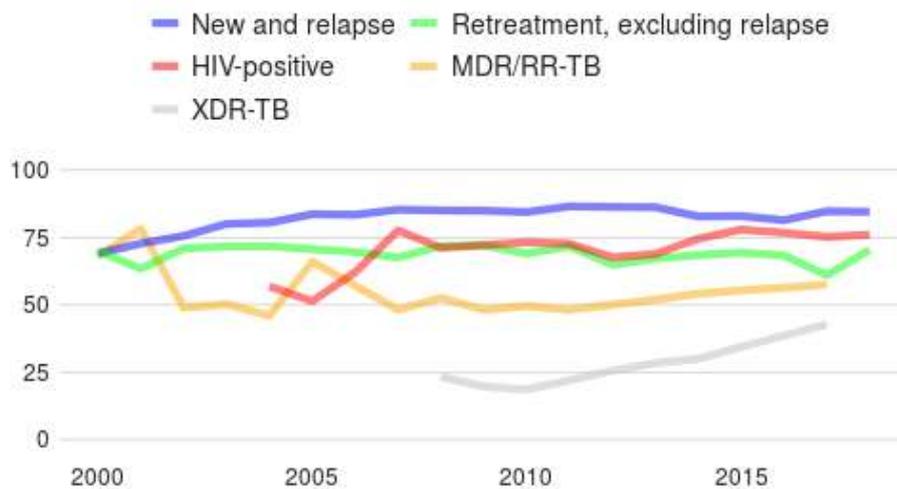


Figura 2. Representación gráfica de la prevalencia de nuevos casos de tuberculosis (nuevos casos diagnosticados y recaídas) en comparación con la prevalencia de personas VIH positivo con tuberculosis. Así como su asociación a la resistencia a antimicrobianos. Datos obtenidos de por la OMS en 2019 con un número de 7686 millones de habitantes (51).

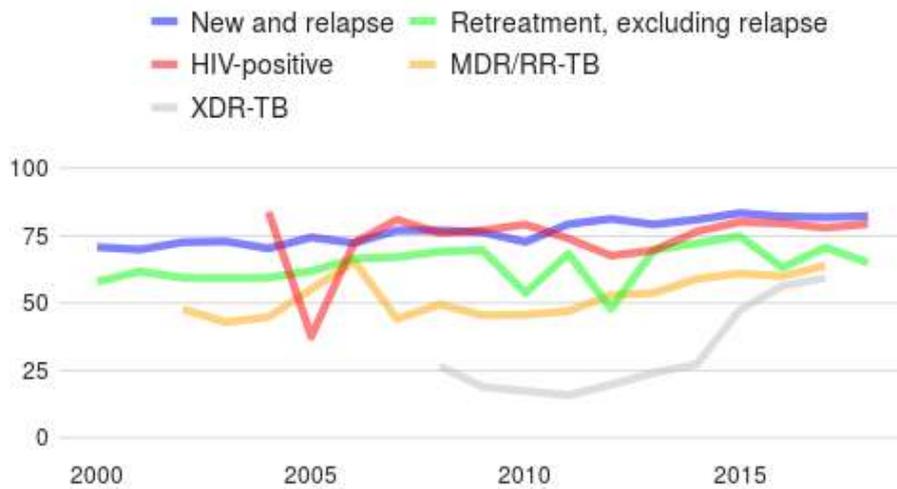


Figura 3. Representación gráfica de la prevalencia de nuevos casos de tuberculosis (nuevos casos diagnosticados y recaídas) en comparación con la prevalencia de personas VIH positivo con tuberculosis. Así como su asociación a la resistencia a antimicrobianos. Datos obtenidos de por la OMS en 2019 con un número de 1 092 millones de habitantes en la Región de África de la OMS.(51)

Además, posteriormente se demostró con tipificación molecular el predominio de pacientes infectados por el VIH en los brotes de TB MDR (definida como tuberculosis resistente a rifampicina e isoniazida) y XDR (definida como tuberculosis resistente al menos a cuatro de los antituberculosos principales, de los cuales dos son isoniazida y rifampicina). (3)

Pero el hecho de encontrar evidencia de la coinfección de enfermedades pasadas antes de la era de los antibióticos, indica que este fenómeno está más relacionado con la densidad de población que favorece la transmisión de más enfermedades que con la terapia antimicrobiana. Es probable que las enfermedades humanas pasadas modularan la respuesta del sistema inmune. De hecho existen estudios clínicos en humanos, epidemiológicos y en células humanas in vitro que estudian la susceptibilidad genética de los humanos a las micobacterias. Se sabe que la respuesta inmune innata ayuda a controlar la carga bacteriana de *M.tuberculosis* al modular la respuesta inmune adaptativa. Pero aunque el sistema inmune limite la enfermedad, las células mieloides también sirven como nichos primarios para la replicación de las mycobacterias. De tal modo que existen mecanismos propios del sistema inmune que permiten la nutrición y replicación de la tuberculosis dentro del organismo debido a una adaptación de éste al bacilo, así como la adaptación evolutiva de la tuberculosis mediante la adquisición de múltiples estrategias para escapar del sistema inmune innato evitando así la activación óptima de la inmunidad adaptativa (9, 34).

Además la coinfección con distintas cepas tuberculosas puede afectar de manera muy significativa a la propagación de distintos linajes. Una alta mortalidad, o la presencia de inmunidad cruzada en individuos con infecciones múltiples puede actuar como cuello de botella, contraseleccionando aquellas especies/cepas menos transmisibles. Un ejemplo histórico constatado en Europa fue la coincidencia del declive de la lepra a finales de la Edad Media con el aumento de la tuberculosis. Tanto la mayor virulencia de la tuberculosis como una posible inmunidad cruzada son razones que se aducen para explicar la ausencia de lepra autóctona en Europa hoy en día, puesto que la coinfección por los dos patógenos era frecuente. Otro claro ejemplo en el antiguo Egipto datado alrededor de 800 a.C. se encontraron cuatro momias con ADN antiguo de *M. tuberculosis* y *Plasmodium falciparum*. Así como se ha demostrado enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) en restos precolombinos del norte de Perú junto con infección tuberculosa constatada; o la coinfección de leishmaniasis con tuberculosis en los primeros cristianos de Nubia.

El hecho de que la tuberculosis pueda co-circular con distintos patógenos dificulta la vinculación de una cepa específica de MTB a un contexto histórico específico. Pero ayuda a entender la patocenosis (22), es decir, ayuda a atribuir la morbimortalidad debido a la actuación simultánea de varios patógenos que circulan conjuntamente en una población, permitiendo así una comprensión más compleja de las epidemias pasadas y de la adaptación del sistema inmune a los distintos patógenos emergentes. Se sabe que parásitos unicelulares intestinales y patógenos son responsables de producir efectos inmunomoduladores en su anfitrión, incluida la modulación de la respuesta a infecciones como la tuberculosis.

De tal modo que el estudio de restos históricos no sólo traza la evolución de la tuberculosis en las poblaciones humanas, sino que permite la contextualización del bacilo con los humanos en un marco más complejo al existir en muchas muestras una infección simultánea con otros patógenos que también colaboraron en la modulación del sistema inmune humano.

## **2. Datación molecular bayesiana y el reloj molecular**

Además de la datación directa de muestras de ADN antiguo, la genómica nos permite inferir la cronología en la evolución de un determinado patógeno a partir de muestras más actuales. Esto es posible porque si contamos el número de mutaciones presentes en dos genomas, sabiendo cual es la frecuencia aproximada de mutación en ese organismo, es posible calcular un intervalo de tiempo en el que los dos genomas se separaron (24). Para ello es necesario, no obstante, calibrar la velocidad a la que un microorganismo acumula mutaciones. A este “cronómetro” lo denominamos el reloj molecular.

El reloj molecular<sup>1</sup> es una forma de medir el tiempo transcurrido desde la divergencia de dos linajes actuales a partir de su ancestro común, comparando las secuencias de ADN de las dos especies existentes y contando las diferencias que se han acumulado entre ambas (25, 26).

Mediante cálculos de coalescencia, es posible “fragmentar” el genoma en decenas de miles de segmentos genómicos y calcular el tiempo de coalescencia (definido como el tiempo de divergencia al segmento ancestral común más próximo) de cada uno de ellos. De tal modo que si en el pasado se produjo un fenómeno de cuello de botella demográfico, podemos observar que muchos de dichos fragmentos van a “coalescer” en dicho periodo. Esta aproximación conocida como Pairwise Sequentially Markovian Coalescent (PSMC) ha permitido realizar estudios demográficos del *H. Sapiens*, animales y patógenos (30).

Durante el transcurso de millones de años la tasa de cambios en algunos nucleótidos neutros es directamente proporcional al tiempo transcurrido, si las medidas se limitan a genes adecuados y a linajes muy emparentados. Tales relojes se pueden calibrar en tiempo real por comparación de secuencias de especies cuyos tiempos de divergencia son bien conocidos por el registro fósil, como es el caso del genoma de referencia de la cepa de laboratorio H37Rv para la tuberculosis (25, 26).

Cuando un segmento de ADN se comporta de verdad como un reloj molecular, se convierte en un potente instrumento que permite estimar las fechas en las que sucedieron las separaciones de linajes. Por ejemplo, imaginemos que un segmento de ADN que se encuentra en dos especies se diferencia en cuatro bases (como se ve más abajo) y sabemos que este segmento completo de ADN cambia a una velocidad aproximada de una base cada 25 millones de años. Eso significa que las dos versiones del ADN difieren en 100 millones de años de evolución y que su antepasado común vivió hace 50 millones de años. Dado que cada linaje ha experimentado su propia evolución, las dos especies deben descender de un antepasado común que vivió hace al menos 50 millones de años (figura 4).

---

<sup>1</sup> *El reloj molecular es la forma de describir la relación aproximadamente constante entre el número de cambios observados en la secuencia de un gen o de una proteína entre dos especies y el tiempo transcurrido desde su divergencia de un ancestro común. Aunque hay muchas excepciones, es una primera aproximación muy útil en el estudio de la evolución molecular y una de las bases empíricas de la teoría neutral de la evolución molecular (Kimura 1983).*

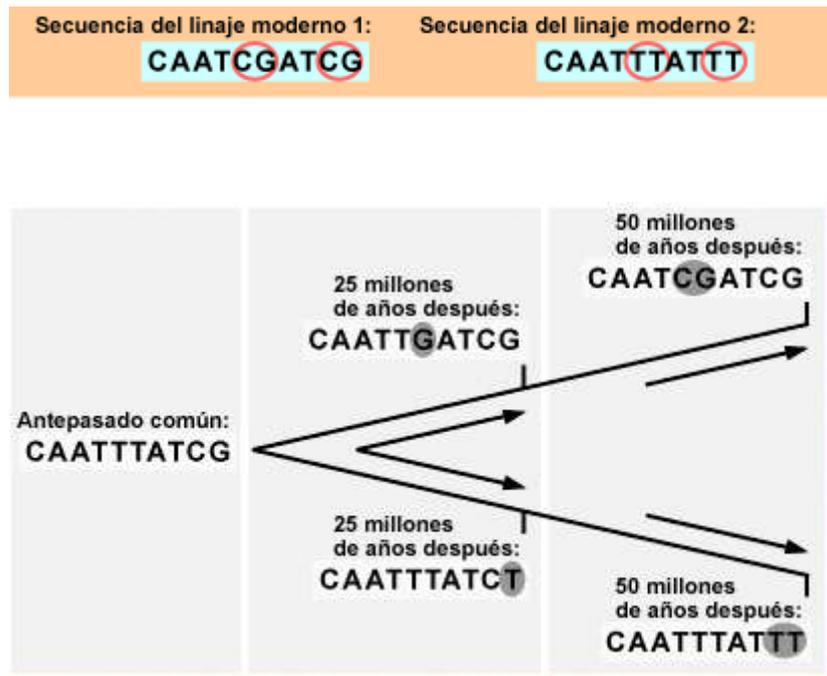


Figura 4. Ejemplo explicativo del reloj molecular de la SESBE

Para estimar el reloj molecular de forma eficaz se puede hacer mediante el estudio de epidemias recientes vinculadas a un clon, estudios observacionales retrospectivos o, midiendo el ritmo de mutaciones dentro de un anfitrión. El concepto detrás de estos enfoques se basa en la ley de Hardy-Weinberg, que en 1908 modelaron una población idealizada para demostrar que en ausencia de selección, migración y deriva genética aleatoria, las frecuencias alélicas permanecen constantes a lo largo del tiempo; por lo que en presencia de apareamiento aleatorio las frecuencias genotípicas están relacionadas con las frecuencias alélicas (33). Es decir, *M. tuberculosis* se compone de "poblaciones en evolución mensurable", lo que significa que los genomas completos acumulan mutaciones nuevas en períodos de meses a años.

Los principales determinantes de las tasas evolutivas son el tipo de ácido nucleico (es decir, ARN o ADN), el tamaño del genoma y el hospedador. Los virus con genomas de ARN monocatenario generalmente sufren mutaciones en escalas órdenes de magnitud más rápidas que aquellos con genomas de ADN bicatenario. El resultado de tal variación de la tasa evolutiva en los genomas microbianos es que el período de muestreo debe considerarse cuidadosamente de acuerdo con el patógeno que se esté estudiando. Los datos de secuencia recopilados de virus de ARN de rápida evolución durante unos pocos años suelen ser lo suficientemente informativos como para permitir estimar su tasa de evolución. En contraste, para bacterias de evolución más lenta como *M. tuberculosis*, un genoma antiguo es a veces esencial para obtener suficiente señal temporal para estimar una tasa evolutiva y una escala de tiempo. La divergencia entre un patógeno y su pariente conocido más cercano establece un límite máximo en el momento de su aparición.

Para *M.tuberculosis* los estudios con WGS estimaron de 0,3 a 0,5 SNP por genoma por año, lo que se traduce aproximadamente en  $1 \times 10^{-7}$  sustituciones por nucleótido por año, sin diferencias notables entre los huéspedes (humanos) (13). Si comparamos la tasa de mutación de *M. tuberculosis* con otros patógenos, vemos que se sitúa en el límite inferior de las especies bacterianas. En comparación, *Staphylococcus aureus* muestra una tasa de mutación de  $1$  a  $2 \times 10^{-6}$ , *Escherichia coli* de  $5 \times 10^{-6}$  (95, 96) y *H. pylori* de  $1 \times 10^{-5}$  a  $7 \times 10^{-4}$  sustitución por nucleótido por año durante la fase aguda de la infección. Otro enfoque para calibrar el reloj se basa en la alta similitud de las filogenias basadas en el mtDNA humano y la filogenia reconstruida de cepas de MTBC obtenidas de restos humanos (13). Estas técnicas se han utilizado para investigar el origen del MTBC, la fecha de la divergencia de *M. tuberculosis* de otras especies del complejo y las fechas de los distintos saltos evolutivos de la tuberculosis en los humanos.

Las técnicas de secuenciación molecular han aportado una perspectiva retrospectiva a la genética de poblaciones, dado que anteriormente tenía un enfoque prospectivo centrados en estimaciones evolutivas. Ahora la información genética junto con la teoría de coalescencia, ha permitido la reconstrucción de los acontecimientos y procesos que habían influido en la distribución de la variación genética observada en la actualidad. La teoría de la coalescencia analiza la distribución de la variación genética presente en poblaciones actuales, a partir de los procesos demográficos y genético-poblacionales ocurridos en la misma, hasta la convergencia de los linajes actuales en su ancestro común más reciente. Esto permite hacer una serie de predicciones bastante ajustadas para acontecimientos como cuánto tiempo tardará en producirse la fusión de dos linajes en su linaje ancestral común (MRCA, Most Recent Common Ancestor) de una población (30).

La aplicación de esta teoría a epidemiología molecular permite la reconstrucción genealógica mediante técnicas de secuenciación de genomas de patógenos e inferencia bayesiana<sup>2</sup>. Además gracias a la filodinámica, termino acuñado por Grenfell et al (2004), se puede identificar y medir procesos epidemiológicos, inmunológicos y evolutivos que caracterizan la variación genética de los patógenos.

Mediante comparaciones de todo el genoma se han descubierto regiones variables resultantes de eventos de inserción / eliminación que permiten datar las distintas cepas del complejo tuberculosis. Así como ya habíamos comentado anteriormente, en el caso de la tuberculosis se ha visto que la delección de la región TbD1 permite diferenciar las cepas en: las cepas ancestrales (TbD1 +) y las cepas modernas (TbD1-). Todas las especies animales (incluidas *M. bovis*, *M. microti* y *M. pinnipedii*), así como *M. canettii* son TbD1- y presentan linajes monofiléticos, por lo que actualmente se consideran ramas ancestrales en el MTBC. Además de estas especies, los linajes 1,5, 6 y 7 actuales de *M. tuberculosis* también son TbD1- (1, 5, 7, 13, 23). Por tanto, los linajes modernos

---

<sup>2</sup> La inferencia Bayesiana es un método de reconstrucción filogenética que emplea tanto la verosimilitud de los datos de las secuencias como probabilidades a priori de los distintos componentes del modelo de evolución para maximizar la probabilidad a posteriori del árbol filogenético resultante.

corresponden a los linajes 2, 3 y 4 , dado que han evolucionado más recientemente. Estos hallazgos sugieren que los linajes animales y *M. africanum* han divergido del progenitor de los linajes ancestrales MTB y que el bacilo tuberculoso era originalmente un patógeno humano, lo que confirma estudios previos que sugerían que las cepas de MTBC adaptadas a animales divergían de las principales cepas MTBC (figura 5). Por tanto, todo ello corrobora que tanto *M. bovis* como *M.tuberculosis* son genéticamente distintos, por lo que sus secuencias genéticas pertenecen a distintos clados<sup>3</sup>, aunque deriven de un patógeno ancestral común.

Los clados filogeográficos pertenecientes a las "cepas modernas" que infectan exclusivamente a los humanos son la cepa de Beijing (muy prevalente en Asia oriental), CAS (Asia central) y Haarlem, X, y LAM (latínamericanMediterranean). Y el grupo que compone las "cepas antiguas" humanas, que tienen menos virulencia, corresponde a *M. africanum* y EAI (India del este de África).

Las técnicas de reloj molecular no solo permiten inferir el origen del complejo MTB, sino que nos permiten trazar la historia de los distintos linajes modernos.

A partir de análisis filogenéticos mediante un enfoque bayesiano<sup>3</sup> para la determinación del ancestro común de la tuberculosis, se estimaron las edades de los clados e inferieron la historia demográfica de los distintos linajes (13, 26). Según estos cálculos se determinó que el origen geográfico más probable del MTBC fue en África oriental y occidental. Los resultados de la investigación del reloj molecular mostraban un origen común en África del Homo sapiens y el MTBC; así como la presencia de tuberculosis en las primeras poblaciones humanas de África hace al menos 70.000 años (18, 27).

Se ha postulado que las cepas ancestrales se diversificaron una vez alcanzaron los primeros asentamientos humanos en la Media Luna Fértil durante y después del inicio de la domesticación, hace 10.000 años (18). Y que posteriormente, la enfermedad se expandió fuera de Mesopotamia, acompañando a diferentes olas de migración humana en África, Asia y Europa, y dieron lugar a patógenos adaptados localmente.

Es decir, las hipótesis planteadas actualmente sugieren que los dos linajes de *M. africanum*, *M. canettii* y el linaje 7 de *M. tuberculosis* podrían haber permanecido en África; mientras que los otros linajes podrían haber llegado a Europa y Asia tras la colonización de estas áreas, y finalmente convertirse en endémicos en todo el mundo. Esto sugiere que los diferentes linajes se han adaptado a diferentes grupos humanos.

Todo ello constata la fuerte asociación y la larga coevolución entre *H. sapiens* y *M. tuberculosis*, demostrada además mediante las nuevas técnicas de secuenciación masiva

---

<sup>3</sup> Clado o grupo monofilético es una agrupación que contiene un antepasado común y todos los descendientes (vivos y extintos) de ese antepasado. (35)

(NGS) que caracterizaron la diversidad genética de un número creciente de cepas que cubren diferentes linajes y grandes distribuciones geográficas. El rastreo del camino evolutivo y las migraciones pasadas de la tuberculosis se llevaron a cabo con estudios a partir de la cepa de referencia H37Rv.

Un estudio reciente llevado a cabo por Sabin y colaboradores, tomando como referencia el genoma anteriormente mencionado, permitió asignar las lecturas de Illumina o Roche 454 de un granuloma calcificado obtenido de los restos momificados del obispo Peder Winstrup de Lund, Suecia. Estas lecturas se agruparon taxonómicamente con MALT, empleando para examinar los datos metagenómicos de los distintos patógenos la base de datos completa de nucleótidos *Gene Expression Omnibus* (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unican.idm.oclc.org/geo/> ), del NCBI (28). Las comparaciones de secuenciación masiva llevadas a cabo sobre el “dataset” LUND1 mostraron que el 85% de las lecturas metagenómicas correspondían a taxones conocidos ya en la base de datos. El análisis visual del perfil metagenómico en MEGAN6 reveló que el 81% de las lecturas de las muestras pertenecían al *Homo Sapiens*, y las otras lecturas coincidían con el nodo del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (18).

Además mediante el uso de LUND1 con un punto de calibración (año de muerte registrado históricamente) se procedió a la datación molecular bayesiana (18). Se reconstruyó un árbol de máxima verosimilitud y alineación para el MTBC que permitió, mediante tasas evolutivas inferidas con la calibración del genoma de *M.tbc* antigua, la estimación de los principales eventos en la historia migratoria del patógeno. Los tiempos inferidos contextualizan la dispersión de *M.tbc* dentro de fenómenos históricos que alteraron los patrones de conectividad en África y Eurasia como el comercio transindico de especias y otros bienes, la Ruta de la Seda y sus predecesores, la expansión del Imperio Romano y la Era Europea de Exploración. Esto revela que las poblaciones de *M.tbc* han crecido a través de la expansión del rango, así como in situ, y delinean las trayectorias evolutivas independientes de las subpoblaciones bacterianas subyacentes a la pandemia actual. Por ello la adición de genomas antiguos a los conjuntos de datos amplía el período de muestreo, lo que permite evaluar una mayor cantidad de cambios evolutivos, permitiendo así una mejor inferencia de la tasa evolutiva del patógeno.

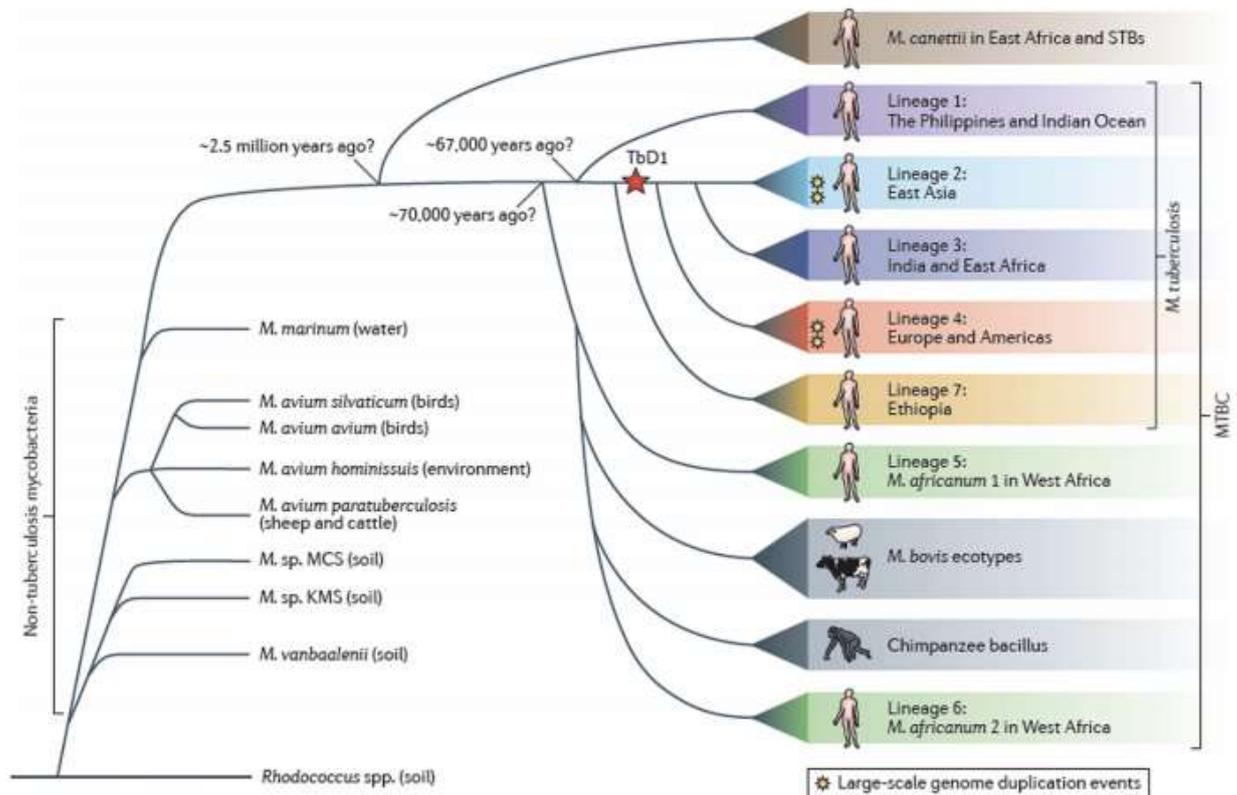


Figura 5: Relación evolutiva entre micobacterias seleccionadas y miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Los ecotipos de *Mycobacterium bovis* adaptados al animal se ramifican de un supuesto linaje de *Mycobacterium africanum* adaptado al ser humano que actualmente está restringido a África Occidental. Las cepas de *M. tuberculosis* adaptadas a humanos se agrupan en siete linajes principales, cada uno de los cuales está principalmente asociado con una distribución geográfica distinta. Las fechas de los eventos de ramificación son estimaciones aproximadas. (29)

#### Parte IV: HISTORIA EVOLUTIVA, DEMOGRÁFICA Y DISEMINACIÓN DEL MTBC

Los **estudios filogenéticos** han aclarado que dentro de MTB se pueden identificar siete linajes, asociados con diferentes áreas del mundo. Los métodos filogeográficos simples aportan información geográfica en las puntas de los árboles filogenéticos para interpretar cómo los eventos migratorios podrían haber dado lugar a la distribución observada. Los enfoques estadísticos formales se utilizan para modelar los movimientos pasados entre ubicaciones geográficas, que se pueden especificar como un rasgo discreto (p. Ej., País o ciudad) o un rasgo continuo (p. Ej., GPS coordenadas). Gracias al ADN antiguo se ha podido trazar las historias geográficas complejas de los patógenos, en este caso podemos observar la evolución de los distintos linajes de la tuberculosis.

L1, que es el primer linaje que surgió de África, se encuentra actualmente entre los linajes más frecuentes en los países que bordean el Océano Índico desde África Oriental

hasta Melanesia (Filipinas). Los estudios sitúan la divergencia del Linaje 1 de MTBC hace unos 67000 años, coincidiendo con la primera ola humana de migración fuera de África, que se dispersó alrededor del Océano Índico. Otra división de MTBC que se ha constatado se produjo hace 46.000 años durante la segunda gran migración de Homo sapiens desde África a Eurasia (7, 13).

La reconstrucción filogeográfica de la migración de L1 se trazó desde África oriental al sur de Asia a través de rutas comerciales establecidas desde África oriental a Asia meridional y sudoriental. Este intervalo de tiempo estimado para la migración inicial de L1 coincide con la llamada esfera de Interacción de Asia Central (2600-1900 a. C.), que se caracteriza por un aumento en el intercambio y comercio con civilizaciones de Egipto, Mesopotamia, la península arábiga y el valle del Indo (25).

El contacto y el comercio Este-Oeste a través del Océano Índico se intensificó en el primer milenio a.C., cuando las redes marítimas se expandieron para incluir el Mediterráneo oriental, el Mar Rojo y el Mar Negro. Los datos históricos de la época romana indican que las tripulaciones de los barcos comerciales que cruzaban el Océano Índico incluían individuos de diversas regiones, reunidos bajo condiciones favorables para la transmisión de la tuberculosis. Se observó que L1 experimentó una expansión local in situ en el siglo XVII como consecuencia del aumento del hacinamiento y/o crecimiento de poblaciones humanas locales.

Además un estudio de la epidemiología de la tuberculosis en Vietnam identificó numerosas migraciones recientes de L2 y L4 en la región, frente a una presencia estable de L1, es decir, las tasas más recientes de migración son de L2 y L4 versus L1. Un patrón similar a L1 se ha identificado previamente, en el retardo entre dispersión de la tuberculosis a través de inmigrantes europeos que llegaron a las Primeras Naciones canadienses, y las posteriores epidemias de tuberculosis debidas a la ecología cambiante de la enfermedad. Esto implica una compleja relación entre el crecimiento y la migración de la población de M.tbc, y la capacidad del patógeno de expandirse a nuevos nichos o acomodar su crecimiento en un nicho existente (25).

Los linajes **euroasiáticos modernos L2 (que incluye a la familia Beijing), L3 y L4** se encuentran estrechamente relacionados filogenéticamente. La datación del **Linaje 2 en Asia** coincide con la llegada de los humanos modernos hacia el Este de Asia hace unos 42000-32000 años. Este linaje presenta una primera expansión hace unos 11000-6000 años correspondiente al desarrollo de la agricultura en China hace unos 8000 años y, más tarde, una nueva expansión hace unos 5000-3000 años, cuando se introdujo la agricultura en las regiones cercanas a China (7). Mediante inferencias se documentó que el comercio marítimo desde Asia Central (Rusia, Asia Central y Asia Occidental) a Europa dio lugar a una época de crecimiento y aumento de la migración de L2, así como la incursión de *Yersinia pestis*, que resultaron en explosivas epidemias de peste y tuberculosis. La experiencia con la peste sugiere que los términos de conectividad entre humanos y otros vectores de enfermedades fueron cambiando en este lugar y momento, lo que potencialmente abriría nuevos nichos para patógenos, incluido M.tbc. Por ello es interesante el estudio de la dispersión del Linaje 2 moderno, que incluye las cepas

“Beijing” que tienen mayor virulencia y potencial de transmisión, con una fase de latencia más corta que los linajes antiguos, además de ser particularmente exitosas en la difusión geográfica. Cabe destacar también que este linaje está asociado a una mayor resistencia a los antibióticos.

Los resultados obtenidos explican la capacidad de adaptación de la tuberculosis a densidades de población de hospedadores tanto bajas como altas. De hecho, debido a su alto nivel de latencia asintomática permite la reactivación de la tuberculosis y la lenta progresión a la enfermedad mediante su adaptación a su hospedador.

Por otro lado, la modalidad de transmisión por aerosol y la alta virulencia para garantizar el máximo nivel de transmisión son típicas de un ambiente poblacional de alta densidad. Estas características propias de la tuberculosis unidas a la aparición de sublinajes como el de Beijing que experimentan tasas de evolución más rápidas en comparación con otros linajes de tuberculosis humana, da lugar a la perpetuación del patógeno y la aparición de nuevas epidemias. Expresamente en el sublinaje de Beijing se detectaron alteraciones en genes *mut*, en su mayoría mutaciones sin sentido que mejoran la adaptabilidad del clado W-Beijing (13). También se objetivó *in vitro* que las cepas cultivadas de *M. tuberculosis* del linaje 2 adquirirían resistencia a los fármacos contra la isoniazida y el etambutol tres veces más rápido que las cepas de *M. tuberculosis* del linaje 4.

L3 surgió en el sur de Asia ca. 520 CE; claro ejemplo de ello es Pakistán, que alberga diversas cepas pertenecientes a L3. Esto es debido a que la región de Asia meridional estaba muy conectada con África oriental mediante el comercio a lo largo de la Ruta de la Seda que conecta Europa y Asia (25).

Las historias migratorias de los linajes africanos 5 y 6 con *M. africanum* distribuidos filogeográficamente en África Occidental son menos complicadas que los de los linajes 1-4. Específicamente, L5 y L6 están restringidos a África occidental; y L7 se encuentran sólo en Etiopía. Las razones de las distribuciones restringidas de estos linajes son debidas a la restricción del patógeno a subpoblaciones humanas con distintos patrones de movilidad y conectividad que no facilitaron la dispersión. Este es el caso de L6 (también conocido como *Mycobacterium africanum*), del cual existe evidencia que sugiere que es menos probable que la infección progrese a una enfermedad activa que para *M. tuberculosis sensu stricto* (13, 25).

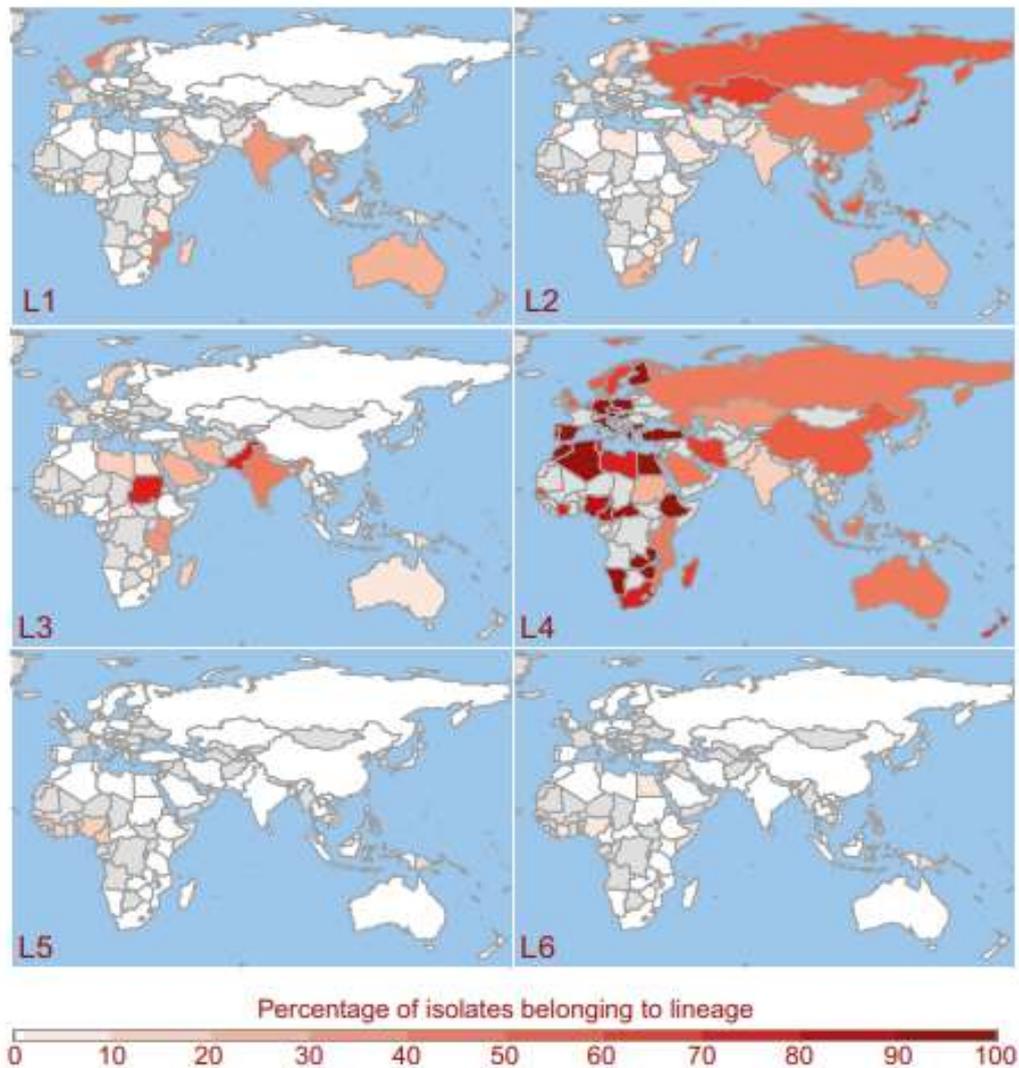


Figura 6: Distribuciones actuales de las frecuencias relativas en los distintos países de los linajes de *Mycobacterium tuberculosis* 1–6. Los países se colorean de blanco a rojo oscuro según el porcentaje de aislamientos del país que pertenecen a cada linaje. Los países sin muestrear y aquellos con <10 aislamientos en la base de datos se muestran en gris. El linaje 7 (no en la foto) se encuentra exclusivamente en Etiopía (25).

La distribución geográfica de L4 es sorprendentemente amplia y presenta una estructura poblacional mínima. Esto sugiere que L4 se dispersó eficientemente y continuó mezclándose fluidamente entre regiones. L4 es actualmente predominante entre linajes en regiones que bordean el Mediterráneo, y en África y Europa. Las estimaciones sitúan el origen del MRCA L4 en el siglo I d.C. (rango 368 a.C.-362 CE), durante el pico del poder **imperial romano** en todo el mundo mediterráneo y las políticas expansionistas romanas en África, Europa y Mesopotamia. El imperio alcanzó su mayor extensión territorial a principios del siglo II d.C., cuando todo el norte de África, desde el océano Atlántico hasta el mar Rojo, estaba bajo un solo poder, con el comercio por tierra y mar facilitado por redes de caminos empedrados y rutas marítimas protegidas. Fuentes primarias de la

civilización romana dan fe de comerciar con China, expediciones intencionadas para exploración, cartografiar y comerciar en el Mar Rojo y el Océano Índico (25).

Por ende el agente epidemiológico de la tuberculosis, causante del mal conocido en su época como "tisis", alcanzó su punto álgido epidémico durante los siglos XVIII y XIX. Durante la era de la industrialización, la enfermedad se asoció con la concentración de la mano de obra y entornos socioeconómicos deficientes que en última instancia favoreció la propagación de este patógeno (31, 43).

Mediante inferencia filogeográfica se encontró que la migración fuera de Europa era casi responsable por sí solo del rango geográfico actual de L4. Sin embargo, "Europa" no debe interpretarse en el estricto sentido, pues probablemente lleva consigo interacciones en la Edad Media con Asia occidental y África del Norte también (43).

En general, sublinajes se encontraron ampliamente dispersos, pero se podían discernir patrones geográficos: L4.5 se restringió al sudeste asiático (Vietnam), mientras que L4.3 (también denominada LAM) estaba subrepresentada en el país. A su vez se observaron divisiones tempranas y distintas dentro de los sublinajes 4.2 y 4.4. El sublinaje L4.2 es un grupo vietnamita anidado dentro del sublinaje estrictamente europeo; mientras que un evento de ramificación temprano separa el sublinaje L4.4 en dos clados: uno detectado exclusivamente en Vietnam y el otro de distribución global. (*figura 7*).

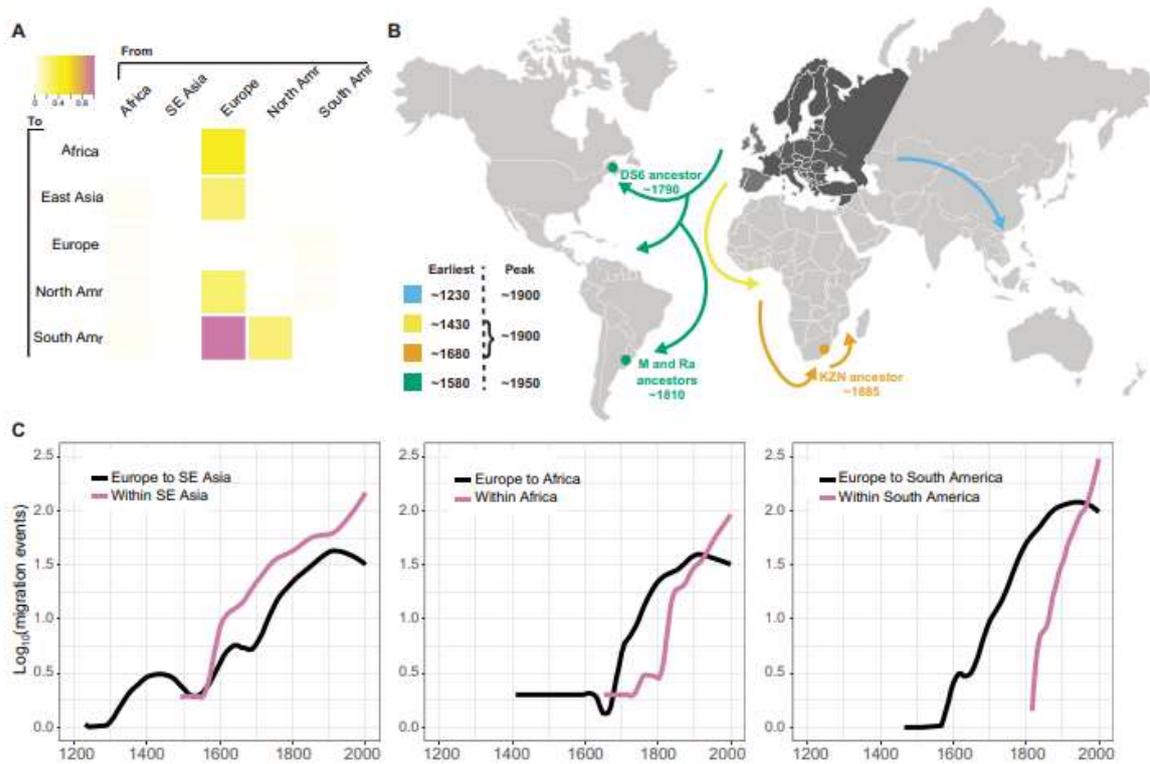


Figura 7: Migración L4. (A) Mapa de calor que resume la carga de migración general entre continentes como se infiere en BASTA. (B) Panorama temporal de la migración L4 fuera de Europa, destacando los movimientos migratorios de interés. (C) Migración fuera de Europa al sudeste de Asia, África y América del Sur a lo largo del tiempo. Los gráficos también muestran la migración / transmisión intercontinental ilustrando la importación repetida de L4 que aporta una importante carga continental de L4 a lo largo del tiempo. (26)

Se evaluó la diversidad global de L4 en función de la geografía gracias a la investigación de las distribuciones de SNPs. Se ilustró el flujo migratorio de Europa a otros continentes a través del tiempo, revelando también la importancia relativa de la importación frente a la transmisión intracontinental. Los análisis filogeográficos realizados sugirieron que las primeras ondas migratorias de L4 fuera de Europa se dirigían hacia el este, que coincide con la primera migración al sudeste asiático (representada por Vietnam) estimada hacia principios del siglo XIII (25). Allí, las poblaciones locales se establecieron rápidamente, y la transmisión interna se volvió dominante a finales del siglo XVI. Estos resultados concuerdan con la estructura poblacional observada de los aislamientos vietnamitas y la alta diversidad observada dentro del país. El actual Vietnam era parte de una gran colonia francesa denominada Indochina francesa desde finales del siglo XIX en adelante (43).

En contraste con lo que observamos para el sudeste asiático, en África, el abastecimiento repetido desde Europa parece haber sido más importante que la transmisión local hasta

el siglo XIX. Estos hallazgos reflejan la historia colonial europea en África, con los primeros fuertes portugueses y puestos comerciales establecidos en el actual Ghana en 1482, seguida de una creciente presencia e influencia europeas en las regiones costeras africanas durante los siguientes siglos (26). Esto indica una clara relación entre la expansión colonial europea y la propagación de la tuberculosis L4 en el continente africano (*figura 7*).

La forma de migración dentro de Africa, en este período de tiempo, estaba relacionada con la expansión del Imperio Zulú bajo Shaka (1816-1828), que obligó a las tribus que huían a migrar hacia el norte y el este. Esto parece haber sido menos importante en la propagación de L4 que el aporte Europeo, pero los nodos internos con descendientes en Congo, Uganda y Malawi que datan del siglo XVIII al siglo XX señalan rutas de transmisión secundarias a través de migración africana interna (26).

De igual modo durante mucho tiempo se especuló sobre si el origen de la tuberculosis en las Americas podía haber sido introducida por los colonos europeos ligado a las rutas migratorias. Se infirieron los tres primeros eventos migratorios en las Américas, datandose entre 1466 y 1593 en América del Sur y entre 1566 y 1658 a Norteamérica. Las estimaciones sugieren que los europeos llevaron la tuberculosis a Sudamérica relativamente poco después de su llegada al continente en 1492. Un aumento abrupto en el flujo de L4 hacia Sudamérica se ve desde el siglo XVII. Pero existen evidencias de la presencia del patógeno antes de la llegada de los colonos. Existen evidencias macroscópicas y moleculares de tuberculosis en restos esqueléticos y tejidos blandos momificados que databan del año 700d.C. (la prehistoria América del Sur, en Perú) y en América del Norte en el año 900 d.C., que confirmaban la presencia de la infección por *Mycobacterium pinnepedii* (un miembro del complejo M.tb generalmente restringido a focas y leones marinos) (26). Esto llevó a pensar que mientras las cepas animales estaban en circulación en algunas poblaciones humanas nativas americanas durante el Nuevo Mundo prehistórico debido a la transmisión de tuberculosis por las focas infectadas a una pequeña población de cazadores indígenas. Y que M.tbc sensu stricto fuera introducido en las Américas por los colonos europeos, seguido de la afluencia continua de L4 con las oleadas posteriores de inmigrantes europeos (*figura 7*). El dominio casi completo de L4 en América del Sur también apoya esta noción. Las enfermedades infecciosas causaron muertes masicas en las poblaciones nativas tras la llegada de los europeos.

Los análisis filogeográficos también permitieron arrojar luz sobre la historia de la cepa KZN, en Sudáfrica, que es responsable de una devastadora epidemia de tuberculosis resistente a los medicamentos (XDR-TB) (36). Se dató hace aproximadamente 130 años el antepasado de la cepa KZN que se dispersó con los europeos a Sudáfrica, coincidiendo con las introducciones de Europa a América Latina de una cepa estrechamente relacionada con la cepa KZN impulsando un brote de TB-MDR en Panamá. (37)

Otro clado interesante que se estudió fue el clado RdRio (identificado como una de las principales causas de tuberculosis en Brasil, y en frecuencias moderadas -altas en Portugal, Estados Unidos y en otros lugares), que sugiere que se originó en Europa hace unos 350 años, seguido de múltiples introducciones a África y las Américas desde hace unos 250 años. El análisis demostró el origen del clado RdRio en Iberia, seguido de las primeras expansiones al Atlántico de América del Sur, Perú y el sudeste de África (38).

El momento inferido de la migración L4 a África y las Américas encaja notablemente bien con la historia de la colonización europea de los continentes. Los análisis filogeográficos sugieren que las primeras ondas de migración de L4 fuera de Europa se dirigía hacia el este, con la primera migración al sudeste asiático (representada por Vietnam) estimada hacia principios del siglo XIII. Las próximas oleadas de migración se dirigieron hacia África, con la introducción más temprana de la tuberculosis en estos países: en la actual República del Congo (Congo-Brazzaville) en el siglo XV, y desde finales del siglo XVII se produjeron posteriores introducciones en Sudáfrica, Uganda y Malawi (África meridional y oriental). En contraste con lo que observamos para el sudeste asiático, el **abastecimiento repetido de Europa** parece haber sido más importante que local (43). Por el contrario, de manera notable en la era de los antibióticos las mutaciones que confieren resistencia a los mismos surgieron a nivel nacional, con una transmisión transfronteriza mínima de la resistencia del respectivo antibiótico. Esto refleja la aparición relativamente reciente de estas mutaciones, ya que se observó un grado similar de restricción local para las variantes susceptibles que emergen en escalas de tiempo comparables (26).

Actualmente existe un rápido aumento de la prevalencia de tuberculosis multirresistente (MDR-TB, TB resistente al menos a rifampicina e isoniazida) y TB extensamente resistente a medicamentos (XDR-TB, MDR-TB con resistencia adicional a cualquier fluoroquinolona y a un antibiotico inyectable de segunda línea (amikacina / kanamicina / capreomíacin) desde la década de 1960 hasta finales de la de 1990, después de lo cual se alcanzó una meseta (26). Gracias a los WGS se ha constatado la varianza genómica entre cepas de MTB que puede dar lugar a diferencias fenotípicas clínicamente significativas (como las ya mencionadas cepas de Beijing), que cursan con un aumento de la resistencia o menor susceptibilidad ante distintos fármacos.

El genoma de 4,4 Mb de *M. tuberculosis* presenta regiones genéticas repetitivas muy variables que abarcan genes como las familias PPE, PE\_PGRS y ESX (39, 40). Esas familias de genes que están involucrados en la reparación del ADN del MTBC son propensas a aumentar las tasas de mutación, dando como resultado fenotipos hipermutadores que están implicados en la rápida adquisición de SNP que confieren resistencia a los antibióticos de segunda generación.

Debido a su capacidad de transmisión por aerosoles infecciosos, la tuberculosis se ha convertido en un problema importante en el mundo de hoy debido al aumento de la

densidad de población. Como ya hemos observado, el cuello de botella evolutivo ha permitido crear nuevas cepas altamente virulentas y fácilmente transmisibles como la de Beijing que se dan en zonas con gran densidad de población. Se identificó en la cepa de Beijing un total de 733 mutaciones que habían surgido más de una vez en el conjunto de datos L4 (3, 13).

Entre ellos se encontró que las mutaciones IldD2 emergieron mucho antes de la era de los antibióticos y han surgido en todos los continentes, lo que sugiere una adaptación local paralela, la mayoría probablemente a grandes cambios en la ecología del hospedador. Los análisis sugirieron que existían diferencias entre los grupos con y sin mutaciones IldD2 y que las cepas que albergan las mutaciones promotoras de IldD2 conllevan un beneficio significativo en términos de transmisibilidad (26, 41).

Otro claro ejemplo es la resistencia a la rifampicina que generalmente se debe a las mutaciones en una región de 81 pares de bases en el gen *rpoB* conocida como región determinante de la resistencia a la rifampicina (RRDR) (42). Es decir pequeños eventos genéticos de un solo polimorfismo de nucleótidos (SNP) pueden dar lugar a resistencia a antituberculosos debido a que los genes son los responsables de la codificación de la proteína diana del fármaco o de proteínas necesarias para su activación.

Las pruebas de amplificación directa de ácido nucleico (NAAT) están desempeñando un papel cada vez más importante en el diagnóstico de la tuberculosis, y la OMS aprobó la prueba Xpert MTB / RIF en 2010. El test Xpert MTB / Rif extrae ácido nucleico, amplifica el RRDR del MTBC, busca mutaciones y las analiza utilizando el software GeneXpert, de tal modo que permite realizar una terapia más dirigida encaminada a prevenir el fracaso terapéutica por la aparición de resistencias.

Es importante señalar que el uso de WGS no sólo permite la detección con precisión de estos SNP para poder definir el mecanismo de resistencia, sino que también permite agruparlos en una biblioteca de referencia de mutaciones de resistencia a partir de las cuales se puede realizar comparaciones.

A partir de varios estudios se mostró que MDR-TB había surgido repetidamente y de forma independiente en todas las regiones geográficas. Al extraer la ubicación geográfica de aislamientos descendentes de los nodos de resistencia (es decir, resistencia heredada), no se identificó ni un solo caso de una cepa resistente que hubiera cruzado las fronteras del país. Se especuló que la corta edad de los nodos de resistencia explica la falta de migración transfronteriza de estas cepas. Solo se encontró un solo nodo que surgió dentro de la era de los antibióticos (después de 1945) con descendientes que han cruzado las fronteras del país en el dataset L4 de Brynildsrud y colaboradores (26).

Esto implica que el modo de replicación clonal de *M.tbc* y su evolución eficiente adaptativa a las poblaciones requiere la evolución paralela de mutaciones beneficiosas. Este es de hecho el patrón que observamos para mutaciones adaptativas en el gen IldD2 del metabolismo del lactato y la aparición de resistencia a múltiples fármacos en la filogenia L4. Además las RAM dentro de la TB L4 refleja adaptaciones locales a esquemas de tratamiento casi idénticos en diversos contextos geográficos. Por lo que se evidencia

que las cepas de *M.tbc* resistente a distintos medicamentos pueden cruzar las fronteras del país, pero la migración sólo ha jugado un insignificante papel en la configuración de los patrones globales de RAM en L4.

Esta restricción geográfica de cepas resistentes es realmente sorprendente y sugiere que el desafío de la resistencia a los antimicrobianos todavía se puede abordar de manera eficiente a nivel de naciones individuales.

## **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

La recuperación de ADN antiguo ha permitido comprender cómo y cuándo emergen y evolucionan los patógenos. Al principio, la investigación del ADN antiguo se basó en la PCR y se utilizó para consultar las dispersiones de humanos y otras especies de vertebrados, agregando alguna investigación de presunta tuberculosis o lepra observada en restos esqueléticos. A finales de la década de 1990, con el incremento de técnicas de secuenciación del ADN antiguo se comenzó a trazar relaciones filogenéticas de patógenos como la tuberculosis desde el Neolítico.

La genética de poblaciones estudia la variación genotípica, sin la necesidad de tener que observar la variación fenotípica, gracias a la presencia de marcadores genéticos y moleculares que permite la construcción de filogenias. Mediante estudios bayesianos de migraciones humanas fuera de África que se aplicaron a genomas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) situaron a su antepasado común más reciente aproximadamente 70.000 años antes del presente, mucho antes de los hallazgos obtenidos por métodos de laboratorio antes mencionados. Este patógeno ancestral se expandió siguiendo las migraciones de *Homo sapiens* fuera de África, adaptándose a los diferentes grupos humanos.

El éxito demográfico de la tuberculosis durante el período neolítico se debió al crecimiento de la densidad y el tamaño de la población humana huésped, y no la transferencia zoonótica del ganado, como se había hipotetizado previamente. Aunque la observación humana paleopatológica hacía posible la idea de una zoonosis, los métodos moleculares descartan que *M.tuberculosis* descienda de *M.bovis*. El escenario más plausible, de acuerdo a los datos actuales, es el de un patógeno ancestral a todo el complejo MTBC con capacidad para infectar a humanos y probablemente otros animales, que se fue especializando en distintos hospedadores. Aunque la domesticación no se encuentre en el origen de la enfermedad humana, esta ha jugado sin duda un papel importante en su evolución. La domesticación animal podría ser importante en sostener una población humana más densa durante la primera transición epidemiológica, permitiendo así a la tuberculosis volverse endémica en pequeñas poblaciones. Además la evidencia paleopatológica de la TB humana atestiguada más antigua sitúa el origen de la enfermedad a partir del Neolítico, por lo que ningún caso esquelético está fechado antes de este período. Es posible, por tanto, que si bien el patógeno precede a la revolución Neolítica, los cambios genéticos en el patógeno se deban a la coexistencia

con otras cepas o microorganismos asociados a un mayor tamaño poblacional que facilitasen la evolución a cepas más virulentas.

A partir de la era industrial, la tuberculosis se difundió fomentada por el aumento de la densidad de población y las malas condiciones de vida. Los principales estudios moleculares recientes sobre la evaluación de su demografía y el momento de propagación parecen mostrar una larga coevolución de la enfermedad y su huésped humano, lo que demuestra que la tuberculosis representa un modelo ejemplar de adaptación a los seres humanos. Es por ello que sigue siendo actualmente una plaga a escala mundial y es la principal causa de muerte infecciosa a nivel mundial.

Debido a determinantes históricos, sociales y geopolíticos, las regiones con las tasas más altas de TB son África subsahariana, Asia sudoriental y Europa oriental. Además la aparición de cepas de tuberculosis resistentes a los antibióticos, en particular a las cepas multifármaco e incluso totalmente resistentes a los fármacos, representa un verdadero desafío en la lucha contra la enfermedad. Así como se ha constatado que la tuberculosis multirresistente (MDR-TB) ha surgido localmente en las últimas décadas, en el sentido de que los clones resistentes han surgido repetidamente en una amplia variedad de lugares, mientras que la migración de cepas resistentes parece haber jugado un papel marginal.

Los patógenos evolucionan en escalas de tiempo similares a aquellas en las que acumulan cambios genéticos que pueden secuenciarse, y los patrones filogenéticos proporcionan información significativa sobre sus procesos epidemiológicos. Estudios genómicos permiten por tanto, determinar la filodinámica de la enfermedad, es decir, la historia de la evolución del patógeno en referencia a su linaje, pudiéndose elaborar distintos modelos de ramificación para inferir parámetros epidemiológicos. La inclusión de datos de ADN antiguo brinda la oportunidad de inferir el ritmo y de pandemias anteriores; y permite el estudio combinado de la coevolución del patógeno y su hospedador. Una limitación para este tipo de estudios es, no obstante, que los modelos coalescentes y de nacimiento-muerte con dinámica constante funcionan bien en el análisis de brotes recientes, pero no son realistas para la compleja dinámica epidemiológica de las enfermedades infecciosas con una historia muy larga. Por tanto, para estudiar procesos de largo desarrollo, como puede ser el surgimiento de los linajes de *Mycobacterium tuberculosis*, o la separación entre las distintas especies del complejo MTBC, es necesario combinar distintas aproximaciones. La obtención de datos paleogenómicos, además de permitir modular los modelos de reloj molecular a procesos de evolución que varían en el tiempo, permiten identificar cuellos de botella y co-infecciones que pueden ser críticas en la evolución del patógeno. El estudio combinado de las fuentes históricas para identificar factores sociodemográficos es también clave a la hora de interpretar la historia evolutiva del patógeno, puesto que aportan datos clave como la densidad de población, la convivencia con animales o las rutas migratorias.

Por consiguiente, para comprender y contextualizar mejor la dinámica que lleva a la evolución de los patógenos y la adaptación del sistema inmune humano a ellos, se debe tener en cuenta las distintas adaptaciones genéticas desarrolladas por las especies que interactúan entre sí dentro de una zona geográfica en la cual se encuentren. Una mejor comprensión de los procesos coevolutivos que acompañaron a la tuberculosis ayuda a entender la dinámica de las epidemias y de los cambios genéticos que llevaron a las distintas cepas y especies de *Mycobacterium* causantes de tuberculosis.

Todo este esfuerzo para comprender el pasado tiene gran importancia tanto para explicar el presente como el futuro, sobre todo teniendo en cuenta el efecto de la globalización de nuestros días, es decir, el aumento dramático de la población y los movimientos individuales que abarcan actividades turísticas, diásporas de refugiados y, próximamente, migrantes climáticos. Hay que tener en cuenta que las grandes radiaciones evolutivas de *M.tuberculosis* están fuertemente asociadas a cambios demográficos profundos. Por tanto, una mayor densidad de población combinada con mayores rutas de intercambio, vinculado a los desequilibrios asociados al cambio climático constituye un escenario preocupante para la evolución de este patógeno.

Esta vorágine en curso tiene múltiples consecuencias, como un número creciente de pacientes infectados por cepas no endémicas, la propagación de cepas multirresistentes (MDR) de países con deficiencia de atención médica y el aterrador espectro de la expansión de cepas totalmente resistentes a los medicamentos.

Actualmente estamos viviendo la tercera transición epidemiológica caracterizada por la globalización de enfermedades infecciosas reemergentes que a menudo son resistentes a múltiples antibióticos, y la aparición de nuevas enfermedades que amenazan a las poblaciones humanas. Un claro ejemplo que refleja la necesidad del estudio de paleomicrobiología de las enfermedades humanas es la pandemia COVID19, que a pesar de la generación de cantidades sin precedentes de datos de la secuencia del genoma y una comprensión detallada de la propagación de su causal agente, el virus SARS-CoV-2, su historia evolutiva sigue siendo un misterio debido a la escasez de muestras, los múltiples reservorios posibles y una compleja historia de recombinación. Retroceder unos siglos e identificar el origen y evolución de los patógenos a partir de ADN antiguo puede proporcionar una visión del pasado evolutivo y epidemiológico, amplificando nuestra comprensión de la aparición de enfermedades infecciosas y colocando así pandemias como COVID-19 en su contexto más amplio, implementando así la eficacia de los programas de control biológico y las pautas de tratamiento.

Estas distintas adaptaciones desarrolladas por las cepas según la zona geográfica en la que se encuentren, llevan a una mejor comprensión de los procesos coevolutivos y la dinámica de las epidemias. Esto permite en última instancia implementar la eficacia de los programas de control biológico y las pautas de tratamiento (32).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Donoghue HD. 2016. Paleomicrobiology of human tuberculosis. *Microbiol Spectrum* 4(4), 4-6. : doi:10.1128/microbiolspec.PoH-0003-2014
2. Lansing M. Prescott, John P. Harley, Donald A. Klein. 2014. "Microbiología" 5ª Edición. Ed. Mc Graw Hill
3. Smith KLJ, Saini D, Bardarov S, Larsen M, Frothingham R, et al. (2014) Reduced Virulence of an Extensively Drug-Resistant Outbreak Strain of Mycobacterium tuberculosis in a Murine Model. *PLoS ONE* 9(4): e94953. doi:10.1371/journal.pone.0094953
4. Sebastian Duchene<sup>1</sup>, Simon Y.W. Ho<sup>2</sup>, Ann G. Carmichael<sup>3</sup>, Edward C. Holmes<sup>4</sup>, and Hendrik Poina. 2020. The Recovery, Interpretation and Use of Ancient Pathogen Genomes. *Current Biology* 30. Elsevier, 3-5
5. Helen D. Donoghue (2019) Tuberculosis and leprosy associated with historical human population movements in Europe and beyond – an overview based on mycobacterial ancient DNA, *Annals of Human Biology*, 46:2, 120-128, DOI: 10.1080/03014460.2019.1624822
6. Celentano, David D., ScD, MHS; Szklo, Moyses, MD, MPH, DrPH. 2020. La ocurrencia de la enfermedad: II. Mortalidad y otras medidas del impacto de la enfermedad. En Celentano, David D., ScD, MHS; Szklo, Moyses. *Gordis- Epidemiología*. (6ªEd, Cap 4, 65-93) Elsevier
7. I. Buzic, V. Giuffra. 2020. The paleopathological Evidence on the origins of human tuberculosis: a review. *J Prev Med Hyg* 61 (1), 3-8. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2020.61.1s1.1379>
8. Ellner, Jerrold J.; Jacobson, Karen R. 2021. Tuberculosis. En Goldman, Lee; Schafer, Andrew I. *Goldman- Cecil. Tratado de medicina interna* (26ª Ed. Cap 308, 2004-2013). Elsevier
9. Murray, Patrick R.; Rosenthal, Ken S.; Pfaller, Michael A. 2021. Mycobacterium y bacterias ácido-alcohol resistentes relacionadas. En Murray, Patrick R; Rosenthal, Ken S.; Pfaller Michael A. *Microbiología medica* (9ª Ed, cap 22, 226-240). Elsevier
10. García García, José María; Palacios Gutiérrez, Juan José. Tuberculosis pulmonar: etiología, patogenia, epidemiología, clínica y diagnóstico. En Álvarez-Sala Walther, José Luis; Casan Clará, Pere; Rodríguez de Castro, Felipe; Rodríguez Hermosa, Juan Luis; Villena Garrido, Victoria. *Neumología Clínica* (2ªEd, cap 40, 323-331) Elsevier.
11. Jeong YJ, Lee KS. 2008. Pulmonary tuberculosis: up-to-date imaging and management. *AJR Am J Roentgenol*. (cap 191, 834-844.)

12. De Baron, E.J., Peterson, L.R., Finegold, S.M., 1994. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*, ninth ed. Mosby, St. Louis, MO
13. Barbier M, Wirth T. 2016. The evolutionary history, demography, and spread of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiol Spectrum* 4(4):TBTB2-0008-2016. doi:10.1128 /microbiolspec.TBTB2-0008-2016.
14. Pérez Arellano, José Luis. 2020. *Factores endógenos de la enfermedad (I): Principios generales de genética. Exploración. En Pérez Arellano, José Luis. Sisinio de Castro. Manual de Patología general (8ªEd, cap 7, 43-54). Elsevier*
15. Christopher Jeanes; Justin O'Grady. 2016. Diagnosing tuberculosis in the 21<sup>st</sup> century-Dawn of a genomics revolution?. *International Journal of Mycobacteriology* 5, 384-391
16. Joel Campbell. 2007. *The SMM model as a boundary value problem using the discrete diffusion equation. Theoretical Population Biology* 72 (4), 539-546. Elsevier
17. Corrales, F.J.; Ávila, M.A.; Berasain, C. 2019. Genómica y proteómica. En Prieto Valtueña, Jesús M.; Ystre Ara, José R. *Balcells-La clínica y el laboratorio (23ª Ed, cap 22, 485-507)*. Elsevier.
18. Susanna Sabin; Alexander Herbig; Åshild J. Vågane; Torbjörn Ahlström; Gracijela Bozovic; Caroline Arcini; Denise Kühnert; Kirsten I. Bos;. 2020. A seventeenth-century *Mycobacterium tuberculosis* genome supports a Neolithic emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Sabin et al. *Genome Biology* 21 (201), 9-10
19. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
20. Havlir D.V., and Barnes P.F.: Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 1998; 340:pp. 367-373
21. OMS PDF
22. Olivier Dutour. 2013. Paleoparasitology and paleopathology. Synergies for reconstructing the past of human infectious diseases and their pathocenosis. *International Journal of Paleopathology* (vol. 3), 145-149: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpp.2013.09.008>
23. Jonathan Kevin Sia; Maria Georgieva; Jyothi Rengarajan. 2015. Innate Immune Defenses in Human Tuberculosis: An Overview of the Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and Innate Immune Cells. *Journal of Immunology Research* (vol. 2015): <http://dx.doi.org/10.1155/2015/747543>
24. Cobo, Erik; Muñoz, Pilar; González, José Antonio; Bigorra, Joan; Corchero, Cristina; Miras, Francesc; Selva, Albert; Videla, Sebastià. 2007. Principios de inferencia. *Bioestadística para no estadísticos. (Capítulo 5, 91-127)*. Elsevier
25. Mary B. O'Neill; Abigail Shockey; Alex Zarley; William Aylward; Vegard Eldholm; Andrew Kitchen; Caitlin S. Pepperell. 2019. Lineage specific histories of *Mycobacterium tuberculosis* dispersal in Africa and Eurasia. *Molecular Ecology*. Vol.28, 3241–3256. DOI: 10.1111/mec.15120
26. Ola B. Brynildsrud; Caitlin S. Pepperell; Philip Suffys; Louis Grandjean; Johana Monteserin; Nadia Debech; Jon Bohlin; Kristian Alfsnes; John O.-H. Pettersson; Ingerid Kirkeleite; Fatima Fandinho; Marcia Aparecida da Silva; Joao Perdigao; Isabel Portugal; Miguel Viveiros; Taane Clark; Maxine Caws; Sarah Dunstan; Phan Vuong Khac Thai; Beatriz Lopez; Viviana Ritacco; Andrew Kitchen; Tyler S. Brown;

- Dick van Soolingen; Mary B. O'Neill<sup>3</sup>; Kathryn E. Holt; Edward J. Feil; Barun Mathema; Francois Balloux; Vegard Eldholm. 2018. Global expansion of Mycobacterium tuberculosis lineage 4 shaped by colonial migration and local adaptation. Brynildsrud et al., Science Advance; vol.4
27. Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato- Maeda M, Parkhill J, Malla B, Berg S, Thwaites G, Yeboah-Manu D, Bothamley G, Mei J, Wei L, Bentley S, Harris SR, Niemann S, Diel R, Aseffa A, Gao Q, Young D, Gagneux S. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of Mycobacterium tuberculosis with modern humans. Nat Genet 2013;45:1176-82. <https://doi.org/10.1038/ng.2744>
  28. Dopazo Blázquez, J.; 2020. Bioinformática médica. En von Domarus, A.; Farreras, P.; Rozman, C.; Cardellach, F.; Nicolás, J.M.<sup>a</sup>; Cervera, R.; Agust, A.; Brugada, J.; Campistol, J. M.<sup>a</sup>; Carmena, R.; Carreres, A.; Castells, A.; Dalmau, J.; De La Sierra, A.; Duró, J.C.; Esteller, M.; Ferrándiz, C.; Gatell, J.M.<sup>a</sup>; Ginés, P.; Gomis, R.; Graus, F.; Nogué, S.; Prat, A.; Pujol-Borrell, R.; Rey-Joly, C.; Riambau, V.; Ribera, J.M.<sup>a</sup>; Urbano, Á.; Vieta, E.; Vilardell, M.; Selva, A.; Castro, P.; Farreras Rozman-Medicina Interna (9<sup>a</sup> Ed, cap 149, 1139-1145). Elsevier
  29. James. E. Galghan, Departamento de Ingeniería Biomédica, Programa de Bioinformática y Laboratorio Nacional de Enfermedades Infecciosas Enfermedades Infecciosas Emergentes, Universidad de Boston, Boston, Massachusetts, EEUU., Y Broad Institute of Massachusetts Insitute of Technology y Harvard, Cambridge, Massachusetts, EE.UU. Reimpreso de Nature Reviews Genetic con permiso del editor
  30. Fernando González Candelas. 2020. La evolución, herramienta básica para estudiar los virus SARS-CoV-2. Boletín de la SESBE Vol. 14(11) 23-33
  31. George J. Armelagos; Peter J. Brown; Bethany Turner. 2004. Evolutionary, historical and political economic perspectives on health and disease. Social Science & Medicine 61, 755–765
  32. Manuel Soler. COEVOLUCIÓN. DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL Y ECOLOGÍA, FACULTAD DE CIENCIAS. UNIVERSIDAD DE GRANADA. (Ed18071, cap.12)
  33. Josefa Cabrero; Juan Pedro M. Camacho; Fundamentos de Genética de poblaciones. Departamento de Genética. Universidad de Granada (cap6, 84-117).
  34. Santiago Merino. 2013. EVOLUCIÓN DE LA INTERACCIÓN PARÁSITO-HOSPEDADOR. MUSEO NACIONAL DE CIENCIAS NATURALES. (Ed. 28006, Cap 31, 487-491) CSIC
  35. Dupuis, Claude (1984). «Willi Hennig's impact on taxonomic thought». Annual Review of Ecology and Systematics 15: 1-24. [ISSN 0066-4162](https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.15.1.1)
  36. Brown TS, Challagundla L, Baugh EH, Omar SV, Mustaev A, Auld SC, Shah NS, Kreiswirth BN, Brust JCM, Nelson KN, Narechania A, Kurepina N, Mlisana K, Bonneau R, Eldholm V, Ismail N, Kolokotronis SO, Robinson DA, Gandhi NR, Mathema B. Pre-detection history of extensively drug-resistant tuberculosis in KwaZulu-Natal, South Africa. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Nov 12;116(46):23284-23291. doi: 10.1073/pnas.1906636116. Epub 2019 Oct 28. PMID: 31659018; PMCID: PMC6859317.

37. Dlamini MT, Lessells R, Iketleng T, de Oliveira T. Whole genome sequencing for drug-resistant tuberculosis management in South Africa: What gaps would this address and what are the challenges to implementation? *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis.* 2019 Jul 9;16:100115. doi: 10.1016/j.jctube.2019.100115. PMID: 31720436; PMCID: PMC6830177.
38. Vasconcellos SE, Acosta CC, Gomes LL, Conceição EC, Lima KV, de Araujo MI, Leite Mde L, Tannure F, Caldas PC, Gomes HM, Santos AR, Gomgnimbou MK, Sola C, Couvin D, Rastogi N, Boechat N, Suffys PN. Strain classification of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Brazil based on genotypes obtained by spoligotyping, mycobacterial interspersed repetitive unit typing and the presence of large sequence and single nucleotide polymorphism. *PLoS One.* 2014 Oct 14;9(10):e107747. doi: 10.1371/journal.pone.0107747. PMID: 25314118; PMCID: PMC4196770.
39. Ates LS, Dippenaar A, Ummels R, Piersma SR, van der Woude AD, van der Kuij K, Le Chevalier F, Mata-Espinosa D, Barrios-Payán J, Marquina-Castillo B, Guapillo C, Jiménez CR, Pain A, Houben ENG, Warren RM, Brosch R, Hernández-Pando R, Bitter W. Mutations in *ppe38* block *PE\_PGRS* secretion and increase virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Microbiol.* 2018 Feb;3(2):181-188. doi: 10.1038/s41564-017-0090-6. Epub 2018 Jan 15. PMID: 29335553.
40. Abdallah AM, Savage ND, van Zon M, Wilson L, Vandenbroucke-Grauls CM, van der Wel NN, Ottenhoff TH, Bitter W. The *ESX-5* secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates the macrophage response. *J Immunol.* 2008 Nov 15;181(10):7166-75. doi: 10.4049/jimmunol.181.10.7166. PMID: 18981138.
41. Billig S, Schneefeld M, Huber C, Grassl GA, Eisenreich W, Bange FC. Lactate oxidation facilitates growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *Sci Rep.* 2017 Jul 25;7(1):6484. doi: 10.1038/s41598-017-05916-7. Erratum in: *Sci Rep.* 2018 Mar 22;8(1):5241. PMID: 28744015; PMCID: PMC5526930.
42. Mvelase NR, Pillay M, Sibanda W, Ngozo JN, Brust JCM, Mlisana KP. *rpoB* Mutations Causing Discordant Rifampicin Susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*: Retrospective Analysis of Prevalence, Phenotypic, Genotypic, and Treatment Outcomes. *Open Forum Infect Dis.* 2019 Feb 12;6(4):ofz065. doi: 10.1093/ofid/ofz065. PMID: 31024968; PMCID: PMC6475586.
43. Armelagos GJ, Brown PJ, Turner B. Evolutionary, historical and political economic perspectives on health and disease. *Soc Sci Med.* 2005 Aug;61(4):755-65. doi: 10.1016/j.socscimed.2004.08.066. Epub 2004 Nov 26. PMID: 15950089.
44. Bennett RJ, Baker KS. Looking Backward To Move Forward: the Utility of Sequencing Historical Bacterial Genomes. *J Clin Microbiol.* 2019 Jul 26;57(8):e00100-19. doi: 10.1128/JCM.00100-19. PMID: 31092597; PMCID: PMC6663899.
45. Rivera-Perez JI, Santiago-Rodriguez TM, Toranzos GA. Paleomicrobiology: a Snapshot of Ancient Microbes and Approaches to Forensic Microbiology. *Microbiol Spectr.* 2016 Aug;4(4):10.1128/microbiolspec.EMF-0006-2015. doi: 10.1128/microbiolspec.EMF-0006-2015. PMID: 27726770; PMCID: PMC5287379.

46. Fornaciari A. Environmental Microbial Forensics and Archaeology of Past Pandemics. *Microbiol Spectr.* 2017 Jan;5(1). doi: 10.1128/microbiolspec.EMF-0011-2016. PMID: 28233511.
47. Arning N, Wilson DJ. The past, present and future of ancient bacterial DNA. *Microb Genom.* 2020 Jul;6(7):mgen000384. doi: 10.1099/mgen.0.000384. PMID: 32598277; PMCID: PMC7478633.
48. Aboudharam G. Sources of Materials for Paleomicrobiology. *Microbiol Spectr.* 2016 Aug;4(4). doi: 10.1128/microbiolspec.PoH-0016-2015. PMID: 27726809.
49. Abi-Rached L, Raoult D. Paleogenetics and Past Infections: the Two Faces of the Coin of Human Immune Evolution. *Microbiol Spectr.* 2016 Jun;4(3). doi: 10.1128/microbiolspec.PoH-0018-2015. PMID: 27337483.
50. Recht J, Schuenemann VJ, Sánchez-Villagra MR. Host Diversity and Origin of Zoonoses: The Ancient and the New. *Animals (Basel).* 2020 Sep 17;10(9):1672. doi: 10.3390/ani10091672. PMID: 32957467; PMCID: PMC7552289.
51. [https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb\\_profiles/?inputs &lan=%22ES%22&entity\\_type=%22group%22&group\\_code=%22global%22](https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?inputs&lan=%22ES%22&entity_type=%22group%22&group_code=%22global%22)