

San Braulio - 2006 (24 de marzo)



Desarmando
“El bacilo de la
tuberculosis”

Carlos Martín Montañés

Desarmando «El bacilo de la tuberculosis»

Carlos Martín Montañés

Estas páginas responden a la generosa invitación del Excmo. Sr. Rector de la Universidad de Zaragoza, Dr. Felipe Pétriz, para que corriera a nuestro cargo la alocución, que, con motivo de la festividad de nuestro Patrón San Braulio, tiene lugar este 24 de Marzo de 2006 en el Paraninfo de nuestra Universidad.

Pretenden presentar nuestra modesta aportación escolar y científica, que dedicamos a los padrinos de este Acto, los Catedráticos de Microbiología de la Facultad de Medicina Dra. Dña. María del Carmen Rubio Calvo y Dr. D. Rafael Gómez-Lus, fundador de la Escuela de Investigación en Microbiología de nuestra Universidad, a los investigadores de grupos nacionales e internacionales, con los que tanto hemos compartido, y —con un cariño especial— a cada uno de los miembros de nuestro grupo de investigación, verdaderos protagonistas del presente trabajo.

LOS MICROBIOS Y LAS ENFERMEDADES

Desde el inicio de su existencia, el ser humano se encuentra en contacto con gran número de microorganismos. De los cientos de miles de especies microorganismos que existen, sólo unos pocos causan enfermedades en hombres y animales. Las enferme-

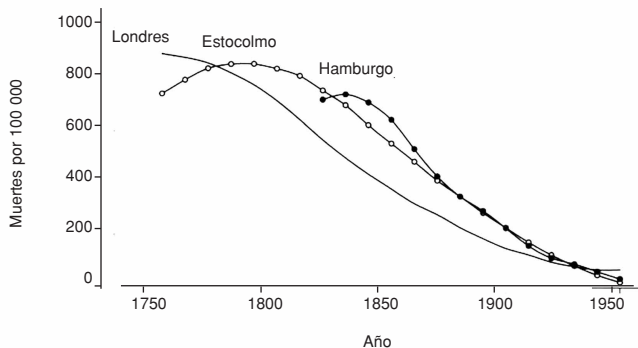
dades producidas por estos pocos microbios, desde que el hombre comienza a vivir en comunidad, han causado grandes y graves epidemias de enfermedades infecciosas como la viruela, el cólera y la peste, que hacen que —de forma cotidiana— asociemos microbios con enfermedad.

Hoy, gracias al descubrimiento y al uso sistemático de vacunas y antibióticos, es posible el control de muchas de estas mortíferas epidemias. El descubrimiento, a finales del siglo XVIII, por Jenner de la vacuna contra una de estas enfermedades, la viruela, y la amplia distribución y administración de su vacuna en expediciones filantrópicas, como la de Balmis-Salvany, hicieron posible que, en 1979, —por primera vez en la historia de la humanidad— la Organización Mundial de la Salud declarara erradicada del planeta a una enfermedad infecciosa, la viruela. Actualmente, las vacunas son el método de intervención en Salud Pública que presenta una mejor relación coste-beneficio, y con las que es posible la erradicación de enfermedades infecciosas.

En los inicios del siglo XXI, las tres enfermedades infecciosas que causan mayor número de muertes en el mundo son las llamadas enfermedades de la pobreza, que incluyen la tuberculosis, el SIDA y la malaria (denominadas por los anglosajones «The Big Three»).

APUNTES HISTÓRICOS SOBRE LA TUBERCULOSIS

Respecto a la enfermedad que ocupa nuestra atención, la tuberculosis, es tan antigua como la humanidad. Esta enfermedad se ha descrito en momias egipcias, con más de 3.000 años de antigüedad, así como en momias precolombinas. La tuberculosis causó una gran mortalidad en las ciudades europeas durante los siglos XVIII y XIX, siendo en el siglo XIX la principal causa de mortalidad de la juventud europea.



La tuberculosis en el siglo XXI era la primera causa de mortalidad de la juventud europea. El número de muertes causadas por tuberculosis disminuye enormemente en las grandes ciudades de los países industrializados de mediados del siglo XVIII, a mediados del siglo XX debido a las medidas de higiene, a las campañas de prevención y a la introducción de un tratamiento efectivo antituberculoso. (Amm Rev Tuberc Pulm Dis 1958).

Tras el descubrimiento por Koch del bacilo causante de la tuberculosis y su descripción el 24 de marzo de 1882, las medidas de higiene y prevención se fundamentaron en la detección de casos y en el aislamiento de los enfermos que eran tratados en los sanatorios antituberculosos. La «lucha organizada contra la tuberculosis» unida a la mejora de las condiciones de vida permitió disminuir drásticamente el número de muertos en los países industrializados.

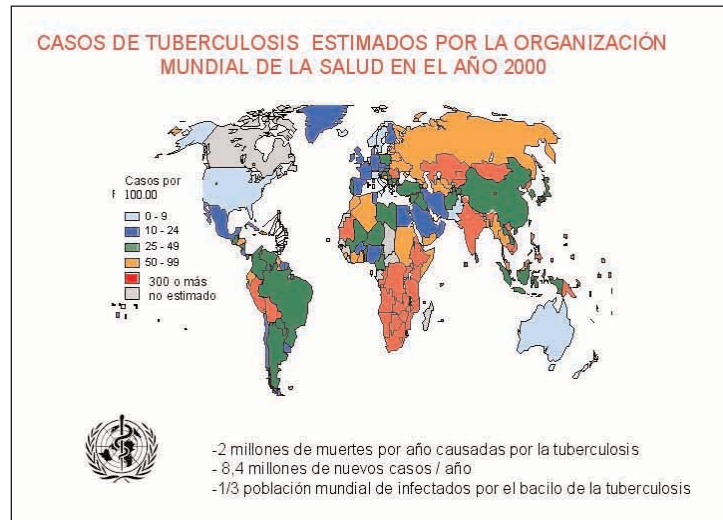
En los años veinte, Calmette y Guérin, tras cultivos sucesivos del bacilo de la tuberculosis en el laboratorio, logran que pierda su virulencia y desarrollan la vacuna denominada BCG (Bacilo de Calmette et Guérin). Esta vacuna ha mostrado su eficacia contra las formas más graves de tuberculosis como son las localizaciones meníngea y diseminada. En la segunda mitad del siglo XX se descubrieron fármacos eficaces contra esta enfermedad. Administrados de forma conjunta y durante prolongados períodos de tiempo, constituyen un arsenal terapéutico eficaz para el tratamiento de la tuberculosis.



Campañas de la lucha contra la tuberculosis. Sello de correos en el que se ilustra la gran repercusión social de las campañas de «lucha contra la Tuberculosis» en los años cincuenta en España.

SITUACIÓN ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS EN EL MUNDO

El conocimiento de la historia natural de la enfermedad, la mejora de los métodos diagnóstico y la existencia de un tratamiento eficaz llevaron a considerar en los países industrializados que la enfermedad se encontraba bajo control. En 1993, la Organización Mundial de la Salud declaró la tuberculosis como emergencia global estimando que, anualmente, el número de nuevos casos superaría los 10 millones y causaría 2 millones de muertos. El mismo organismo estima que, en la presente década, se producirán 90 millones de nuevos casos y se alcanzarán los 30 millones de muertos.

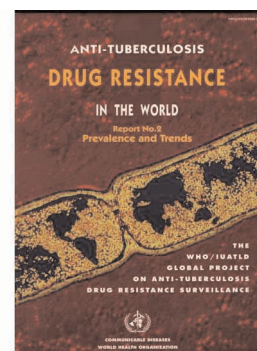


La tuberculosis en el mundo. En 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la situación de emergencia contra la tuberculosis, estimando en 2 millones el número de muertos al año causados por el bacilo de la tuberculosis. Al inicio del siglo XXI la tuberculosis junto a sida y malaria son las enfermedades infecciosas más mortíferas en el planeta.

En los años noventa, saltó la alarma en los países industrializados. El número de casos experimentó un aumento registrándose un número de enfermos superior al esperado y se detectaron formas epidémicas de tuberculosis resistentes a los fármacos convencionales en hospitales de estos países; la tuberculosis se convertía de nuevo en una enfermedad incurable. Desde los años sesenta, en que se iniciaron los primeros tratamientos, se han descrito cepas resistentes a los distintos antituberculosos. Sirva de ejemplo que, en abril de 1991, el 33 % de las cepas aisladas en Nueva York eran resistentes al menos a un antibiótico. La mala cumplimentación del tratamiento está considerado el principal factor asociado con la aparición de resistencias. Actualmente los países en vías de desarrollo, especialmente África Subsahariana, amplias zonas de Asia y algunas naciones latinoamericanas, son los que presentan un mayor número de casos de tuberculosis. Un informe reciente de la Organización Mundial de la Salud señala que se está produciendo un aumento de casos de tuberculosis resistentes a los fármacos ocasionando serios problemas de Salud Pública y añade que, en algunos países de la antigua Unión Soviética, se han detectado epidemias de tuberculosis resistente, considerándose el control de estas epidemias una prioridad (OMS 2004). Esta fragilidad nos hace recordar que para las enfermedades infecciosas no existen las fronteras y que todos continuamos siendo vulnerables la tuberculosis.

LA ESTRATEGIA DEL BACILO DE LA TUBERCULOSIS

Comparado con otras bacterias, el bacilo de la tuberculosis se multiplica muy lentamente (24 horas). Crece dentro de las células que infecta, en la tuberculosis humana su único hábitat es el ser humano, transmitiéndose entre personas por vía respiratoria. Tras ser



Hoy la tuberculosis resistente a los fármacos vuelve a ser una enfermedad incurable. La Organización Mundial de la Salud estudia las regiones donde se aíslan cepas de tuberculosis resistentes a los fármacos, destacando entre ellos la antigua Unión Soviética.

infectadas por el bacilo, entre un 5 y un 10 por ciento de las personas infectadas desarrollan la enfermedad, siendo multifactorial la susceptibilidad a la enfermedad. Entre las múltiples causas que se asocian con desarrollar una tuberculosis se encuentran factores genéticos, pero también factores ambientales que pueden disminuir las defensas del individuo, como una mala alimentación asociada a la pobreza o enfermedades que afectan al sistema inmunológico, como el SIDA.

Estudios moleculares recientes muestran que la estrategia de crecimiento lento del bacilo de la tuberculosis es muy eficaz y que su adaptación al ser humano es relativamente reciente, en comparación con otros microbios, existiendo una gran similitud entre todos los aislamientos del bacilo de la tuberculosis, que serían descendientes de un antecesor común^[36]. La hipótesis es que el bacilo infectó a los primeros humanos, aproximadamente hace 15.000 o 20.000 años, cuando el ser humano comienza a vivir en sociedad en comunidades agrícolas y ganaderas^[5].

LA ESTRATEGIA DEL INVESTIGADOR:

PRIMERO ESTUDIAR PARA LUEGO PODER DESACTIVAR AL BACILO

Estudiando al bacilo

Epidemiología Molecular de la Tuberculosis: Siguiendo el rastro del bacilo de la tuberculosis

Los estudios moleculares permiten diferenciar una cepa del bacilo de la tuberculosis que ha producido enfermedad en un determinado paciente. El descubrimiento de la secuencia de inserción denominada IS6110, secuencia específica y repetida de forma variable entre las distintas cepas del bacilo, permite la diferenciación de cepas y seguir el rastro del bacilo de la tubercu-

losis. IS6110 está presente en número variable de copias y éstas se localizan en las diferentes cepas en distintas posiciones del cromosoma de forma polimórfica. El estudio de esta secuencia, en cada cepa, permite obtener un patrón similar a un código de barras.

Nuestros primeros trabajos se dirigieron al estudio de la estabilidad de este polimorfismo. Se estudiaron las cepas aisladas de pacientes tuberculosos y cepas aisladas de los mismos pacientes años más tarde^[37]. Confirmar que el patrón permanecía estable, nos permitió considerar su potencial utilidad en la detección de futuras epidemias. Posteriormente, nuestros esfuerzos se dirigieron a conocer el mecanismo biológico de ese polimorfismo, descubriendo que era debido al salto o transposición de esta secuencia IS6110^[35]. Comprobada la utilidad del método, por su estabilidad en el tiempo y su universalidad entre cepas, al deberse a un mecanismo de transposición o salto común a otras bacterias, el método de diferenciación de cepas de bacilos de la tuberculosis comenzó a ser empleado por diferentes laboratorios de todo el mundo, pero, al utilizarse diferentes sitios de corte del genoma de bacilo y marcando ese polimorfismo de forma diferente, no permitía la comparación entre laboratorios. En una reunión celebrada en los CDC (Centers for Disease Control) de Atlanta, se planteó la necesidad de estandarizar el método de diferenciación de las cepas por RFLP (Polimorfismo de los Fragmentos de Restricción), con la secuencia de inserción IS6110, para su uso universal en la medicina humana. En este consenso participó activamente nuestra Universidad junto con, entre otros, los CDC de Atlanta, el Instituto Pasteur de París, el RVIM de Holanda^[52]. Actualmente, éste es el método universalmente utilizado para la diferenciación del bacilo de la tuberculosis y es utilizado sistemáticamente para estudios epidemiológicos. El método publicado en el artículo de Van Embden *et al* de 1993 continúa siendo el pa-



El bacilo de la tuberculosis puede diferenciarse permitiendo seguir su rastro: similar a un código de barras. El bacilo de la tuberculosis se divide cada 24 horas y para ver las colonias en el laboratorio se tarda casi un mes. Hasta hace 10 años era imposible distinguir los bacilos aislados de los distintos enfermos. Hoy, gracias a las técnicas de Biología Molecular, podemos diferenciar los bacilos aislados de cada individuo, obteniendo una identificación similar al código de barras que nos permitirá seguir la transmisión del bacilo.



Estudios de epidemiología molecular. El bacilo de la tuberculosis de cada enfermo se estudia genéticamente y se compara con el de los otros enfermos.

trón universal de la epidemiología molecular de la tuberculosis y es el más citado en todos los artículos publicados por la comunidad científica aragonesa, en los que participa nuestra Universidad. Después de más de 12 años de uso en estudios de epidemiología molecular del bacilo de la tuberculosis por RFLP-IS6110, sigue siendo el patrón oro y decenas de miles de cepas en todo el mundo han sido estudiadas de forma estandarizada, permitiendo la comparación de bases de datos, lo que facilita el estudio del comportamiento del bacilo. Los resultados de estas técnicas se pueden analizar mediante programas informáticos de análisis de imágenes y son almacenados en bases de datos. Cada patrón o código de barras de las nuevas cepas se compara con las ya existentes en la base de datos y, si coinciden, se estudia la relación entre los pacientes. Nuestra Universidad sigue participando en el estudio comparativo internacional de diferentes métodos de tipado, colaborando en la búsqueda de nuevos métodos que permitan acortar tiempos o mejorar la técnica^[38], comparándolos con los métodos utilizados en la actualidad^[29].

Estas técnicas moleculares nos permiten identificar una transmisión de tuberculosis (un individuo sano es contagiado por un individuo enfermo), o una reactivación (una cepa que infectó previamente se encontraba en fase silente en un individuo), según los patrones genéticos de las cepas aisladas de los individuos, sean idénticos o no.

Estudios de Epidemiología Molecular en nuestra Comunidad Autónoma

Los estudios efectuados entre los años 1993 y 1995, fueron pioneros en nuestro país^[49]. Permitieron establecer las similitudes y diferencias de la transmisión de la tuberculosis con estudios internacionales y posteriormente nacionales^[26,46]. Para estos estudios fue fundamental la colaboración de los Servicios de

Microbiología de los dos grandes hospitales de la provincia de Zaragoza: el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa y el Hospital Miguel Servet, así como la de los otros hospitales de nuestra Comunidad Autónoma, hoy pertenecientes al SALUD. Desde el año 2004, en colaboración y coordinación con la Consejería de Sanidad del Gobierno de Aragón, se realiza la caracterización molecular sistemática de las cepas aisladas en nuestra Comunidad Autónoma. Este trabajo permite detectar y estudiar la presencia de los brotes activos, y posibilita a los microbiólogos descartar contaminaciones de laboratorio y diferenciar dentro del complejo *Mycobacterium tuberculosis* las subespecies que afectan a humanos: *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. africanum*. Estas investigaciones también permiten a los epidemiólogos realizar estudios poblacionales e identificar grupos y factores de riesgo, que a su vez permiten a los sistemas de vigilancia epidemiológica de nuestra Comunidad Autónoma el seguimiento de casos y la detección de brotes para un mejor control de la enfermedad^[27]. Desde el punto de vista de la investigación básica, estos estudios nos permiten reconocer cepas que puedan tener aumentada su virulencia, posibilitando el estudio de los mecanismos de patogenicidad del bacilo de la tuberculosis.

También las hemos aplicado las técnicas de epidemiología molecular a los bacilos de la tuberculosis aislados en animales, en colaboración con la Facultad de Veterinaria, para su utilización en medicina veterinaria. Se estudiaron aislamientos de bóvidos y cabras^[23], siendo posible detectar en algún caso la transmisión de determinadas cepas a humanos^[24].

Estudios de Epidemiología Molecular a nivel nacional e internacional

Nuestra Universidad participa de forma muy activa en estudios de epidemiología de la tuberculosis con otras comunidades

auténomas. En Gran Canaria^[39], estos estudios han descrito la posibilidad de reinfección con nuevas cepas del bacilo, en pacientes con una tuberculosis previa^[7], y que la introducción en el año 1993 en la isla de Gran Canaria de una cepa de un determinado patrón genético, denominada «Beijing», produjera ese año el mayor brote de tuberculosis en la isla. Estudios de años posteriores demostraron que esta cepa causó un 30 % de los casos de tuberculosis de toda la isla^[8], indicando, por un lado, la enorme virulencia de esta cepa y, por otro, que el control de ese brote específico reduciría de forma considerable la incidencia de la tuberculosis en la Isla.

Nuestra Universidad también participa en estudios con otras comunidades autónomas como, entre otras, Galicia, Navarra^[12], la Comunidad de Madrid^[6] y la Comunidad Valenciana^[14].

También colabora con grupos de veterinaria nacionales, estudiando la epidemiología de la tuberculosis en animales de ganadería y salvajes^[19]. Igualmente, con grupos de veterinaria latinoamericanos, para el estudio epidemiológico de tuberculosis en explotaciones ganaderas argentinas^[55] y en animales salvajes, como los lobos marinos de las costas argentinas^[54].

Estudio de los mecanismos de adaptación del bacilo a los fármacos antituberculosos: Estudio de los mecanismos de resistencia

Como hemos indicado anteriormente, la utilización de antibióticos constituye una de las formas más eficaces de luchar contra las infecciones bacterianas. El estudio de los mecanismos por los que una bacteria se vuelve resistente a los antibióticos ayuda a prevenir este fenómeno, que representa un grave problema sanitario. Hasta el presente, todas las resistencias descritas en cepas del

bacilo de la tuberculosis estudiadas a nivel genético corresponden a modificaciones en el sitio diana de acción de fármaco. Sin embargo, se han encontrado bacilos resistentes en los que las proteínas diana no están alteradas, por lo que la resistencia está producida por otro mecanismo diferente. Nos interesamos en el estudio de los mecanismos por los cuales el bacilo de la tuberculosis aumenta la capacidad de hacerse más resistente, como es el aumento de tasas de mutación^[42].

Siguiendo la línea de investigación clásica en nuestra Universidad, iniciada por el profesor Gómez-Lus en el estudio de los mecanismos de resistencia en bacterias, la hemos enfocado al estudio de los mecanismos de resistencia aplicado a las micobacterias. Inicialmente, estudiamos las enzimas modificantes a antibióticos^[2,3,4] y actualmente estamos investigando la contribución de las bombas de eflujo en el fenómeno de la resistencia a antibióticos en el bacilo de la tuberculosis, en colaboración con otros laboratorios europeos^[1,50,11]. El bacilo tiene más de 40 bombas de eflujo de distintas familias y estamos estudiando seis nuevas bombas de eflujo de la familia Major Facilitator Superfamily^[40,43].

Epidemiología molecular de la tuberculosis multirresistente

De los fármacos disponibles actualmente para el tratamiento de la tuberculosis, dos de ellos, la isoniacida y la rifampicina, son de enorme importancia. A la bacteria que adquiere resistencia, al menos a estos dos fármacos, la denominamos tuberculosis multirresistente. Por la dificultad de su tratamiento, se convierten en las formas más graves de tuberculosis. Su estudio y control está considerado de enorme importancia, desde el punto de vista sanitario, epidemiológico y de salud pública.



La Universidad de Zaragoza coordina el estudio de tuberculosis multiresistente a nivel nacional. Las formas más graves de tuberculosis son las resistentes a los fármacos antituberculosos. En el Laboratorio de Genética de Micobacterias de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza, en cola

Tras las epidemias de tuberculosis multirresistentes de los años noventa de Nueva York, estudiamos, en colaboración con hospitales de Málaga y Madrid, la primera epidemia de tuberculosis multirresistente ocurrida en España^[48], con una alta tasa de reinfección^[44], que, posteriormente, afectó a gran número de comunidades autónomas, incluida la aragonesa. Una cepa, resistente a la mayor parte de los fármacos conocidos contra la enfermedad, se diseminó entre enfermos con SIDA provocando una elevadísima mortalidad. Después de este suceso, con la idea de detectar posibles epidemias de tuberculosis multirresistentes, y en colaboración con la mayoría de los servicios de Microbiología de los hospitales del país, nuestra Universidad se planteó el estudio sistemático de las cepas multirresistentes de tuberculosis y se estableció una red de vigilancia de la tuberculosis multirresistente española, pionera a nivel mundial^[47].

Estudio de la tuberculosis multirresistente a nivel nacional

Desde enero de 1998, se realiza de forma sistemática el estudio genético de cepas del bacilo de la tuberculosis, multirresistentes a los fármacos, en coordinación con el Instituto de Salud Carlos III de Madrid, donde se informan los casos idénticos que aparecen entre diferentes comunidades autónomas. Este sistema de alerta de brotes de tuberculosis multirresistente posibilita la actuación en caso de epidemias.

La red de vigilancia española de la tuberculosis multirresistente, se denomina Grupo Español de Trabajo sobre TB-MR. Está formada por los laboratorios de micobacterias del Sistema Nacional de Salud, y coordinada por el grupo de Genética de Micobacterias de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza (<http://genmico.unizar.es/>).

Estudio de la tuberculosis multirresistente a nivel internacional

Se ha creado una base de datos de las cepas de tuberculosis multirresistentes, localizada en Holanda, que contiene las cepas de tuberculosis multirresistentes de 32 laboratorios internacionales, participantes en una Acción Concertada de la Unión Europea, donde comparamos la base de datos que coordinamos desde la Universidad de Zaragoza. Esta red permite cotejar y estudiar los distintos patrones genéticos que se aíslan en cada país participante. El intercambio de datos hace posible detectar brotes entre diferentes países^[48,9].

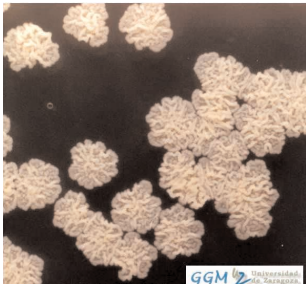
Tradicionalmente, en modelos animales se ha estudiado que los bacilos que se hacen resistentes a los fármacos son menos virulentos, perdiendo su capacidad de infectar tanto al ratón como al cobayo. Estos estudios han sido corroborados por nuestros trabajos de epidemiología molecular, en los que encontramos que las cepas sensibles a los fármacos, en general, se transmiten más que las cepas multirresistentes^[47,45]. Sin embargo... *¡determinadas cepas multirresistentes se transmiten de forma epidémica!*

Desarrollo de herramientas genéticas para estudiar el bacilo de la tuberculosis

En los años setenta se desarrolla la genética y biología molecular, utilizando distintas bacterias y virus como modelos. Las técnicas moleculares aplicadas al bacilo de la tuberculosis se desarrollaron con más de 20 años de retraso. Las razones de esta demora son diversas. El bacilo es difícil de manipular, debe manipularse en laboratorios de seguridad biológica por tratarse de un patógeno que se transmite por vía respiratoria y además presenta un crecimiento lento. Experimentos que, en otras bacterias no patógenas se realizan en días, con el bacilo de la tuberculosis se retrasan meses y años. A todo esto, se sumó el optimismo de los años se-



El bacilo de la tuberculosis un bacilo que se transmite por vía respiratoria. El bacilo de la tuberculosis es una bacteria patógena que se debe trabajar en laboratorios de seguridad biológica.



El bacilo de la tuberculosis pertenece a las «micobacterias». Forma que presentan las bacterias de la familia de las «micobacterias» creciendo en un medio de cultivo.

tenta, en que se pensaba que era posible la erradicación de la tuberculosis, menospreciando al enemigo, creyendo que no sería necesario estudiar y conocer el bacilo para luchar contra él.

Para manipular directamente el bacilo de la tuberculosis, ha sido necesario desarrollar útiles genéticos en microorganismos emparentados, que nos sirven de modelo. Para la puesta a punto de estos nuevos útiles genéticos se eligen las especies no patógenas.

El bacilo de la tuberculosis pertenece al género de las «micobacterias». La investigación genética del género se inicia por dos grupos, a finales de los años ochenta: uno, en Estados Unidos y otro en Europa. El grupo americano está dirigido por el profesor Jacobs de la Facultad de Medicina del «Albert Einstein Institut» de Nueva York, y el grupo europeo por la profesora Gicquel del Instituto Pasteur de París.

Por esta época, distintos miembros del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de nuestra Universidad se forman en el Instituto Pasteur. En este período, se aísla el transposón Tn610, que fue modificado genéticamente, introduciendo un marcador de resistencia a kanamicina, denominándose al nuevo transposón Tn611^[33]. Con éste se demostró, por primera vez, la transposición en micobacterias. También participamos en el desarrollo de las técnicas de manipulación genética por introducción de DNA por electro transformación^[25] y desarrollamos vectores que permiten insertar genes de forma estable en las micobacterias^[32].

Participamos en la construcción de una serie de vectores que replican de forma condicional, como los plásmidos termosensibles para la replicación, para poder seleccionar gran número de sucesos de transposición. La replicación del plásmido, da tiempo a que la transposición ocurra en el interior de la célula, a una temperatura permisiva, y al aumentar la temperatura del cultivo se inhibe

la replicación del plásmido, pudiendo seleccionar estos sucesos de transposición. Estos plásmidos mutantes termosensibles para la replicación en micobacterias fueron obtenidos por mutagénesis química *in vitro* con hidroxilamina. Los mutantes se obtuvieron a partir de plásmidos. Un plásmido derivado de pAL5000 seleccionando mutantes kanamicina resistentes a 30°C y sensibles a 39°C y termosensibles^[20,16], puede ser utilizado para el reemplazamiento génico, por recombinación homóloga en el bacilo de la tuberculosis^[28].

En 1992, en la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza se crea el Grupo de Investigación en Genética de las micobacterias. El Grupo se plantea contribuir al desarrollo de las herramientas necesarias para poder manipular el bacilo de la tuberculosis y buscar nuevos elementos genéticos móviles, «transposones», como útiles de mutagénesis en micobacterias, que faciliten el estudio de los mecanismos de patogenicidad del bacilo de la tuberculosis. Se aíslan otros transposones^[20,13] y se desarrolla un sistema de mutagénesis por transposición de alta eficacia^[22,17,40].

Desde nuestro Grupo también contribuimos a la identificación y construcción de plásmidos en micobacterias que pueden ser útiles para la manipulación del bacilo de la tuberculosis. Se aíslan nuevos plásmidos de cepas clínicas^[15]. Se realizan construcciones de plásmidos para simplificar la manipulación en el laboratorio^[2].

Hoy, el conocimiento generado por decenas de equipos de investigación en tuberculosis como el nuestro, que desde los años noventa se incorporaron al estudio molecular del bacilo, es enorme, destacando la posibilidad de estudios genómicos, a partir del año 1998, en que el equipo del profesor Cole publica la primera secuencia del genoma completo de un bacilo de la tuberculosis.



BCG la actual vacuna contra la tuberculosis. Sello de correos a favor de la campaña de vacunación contra la tuberculosis en Francia.

El importante esfuerzo, invertido en capital humano y recursos en investigación contra la tuberculosis, hace que hoy dispongamos de las herramientas necesarias para poder manipular los bacilos y podamos plantearnos metas tan ambiciosas como desactivar el bacilo de la tuberculosis.

EL SUEÑO DE UNA NUEVA VACUNA CONTRA LA TUBERCULOSIS

La experiencia de vacuna viva BCG

Como comentamos anteriormente, la vacuna actual contra la tuberculosis, BCG, es una vacuna viva atenuada, que confiere protección para los casos graves de tuberculosis. Su uso es recomendado por la Organización Mundial de la Salud en países con alta incidencia de tuberculosis, siendo actualmente BCG la vacuna más utilizada en todo el mundo. En los casos de tuberculosis respiratoria, el grado de protección que confiere es muy variable, encontrándose entre el 70 % en estudios realizados en Inglaterra y la falta de protección en estudios realizados en la India y en personas en las que la tuberculosis se presenta asociada a SIDA. Desarrollar vacunas más eficaces que la actual BCG contra las formas respiratorias y erradicar la tuberculosis es una prioridad.

La vacuna BCG se obtuvo cultivando sucesivamente más de 200 veces en el laboratorio, con las técnicas rudimentarias microbiológicas de la época, un bacilo tuberculoso aislado de vacas, hasta que disminuyó su patogenicidad para los humanos. Los estudios genéticos actuales de la vacuna BCG señalan que más de 100 genes se han perdido en la cepa vacunal en diferentes regiones del genoma, sugiriendo que esta extrema atenuación sea causa de la pérdida de su eficacia. A esto debemos añadir que distintos laboratorios de todo el mundo han subcultivado esta cepa, lo que ha provocado la aparición de diferencias genéticas e inmunológicas entre las distintas variantes de BCG.

Los avances en investigación en el campo de las vacunas, de la inmunología y el desarrollo de la genética de micobacterias, que comentamos anteriormente, hacen posible que nos planteemos la investigación y desarrollo de nuevas vacunas contra la tuberculosis.

Mejorar la eficacia de la actual vacuna BCG

Dos son las estrategias fundamentales en la investigación de nuevas vacunas contra la tuberculosis. Por un lado, mejorar la inmunidad conferida por la actual BCG y por otro, la construcción de nuevas vacunas más eficaces y capaces de reemplazar la actual vacuna BCG^[30].

El Proyecto Europeo «Tuberculosis Vaccine Development» del V Programa Marco de la Unión Europea, ha desarrollado y estudiado más de 100 candidatos a vacuna, basados en proteínas del bacilo (vacunas subunidades) y más de una veintena de vacunas vivas. Actualmente, se están ensayando diversos candidatos en diferentes modelos animales para determinar su grado de atenuación, de inmunidad y de protección, que permita garantizar su eficacia contra la tuberculosis en humanos.

Es la primera vez, en más de 80 años, que nuevos candidatos a vacuna contra la tuberculosis han pasado a Fase I, en ensayos clínicos en humanos, en estudios de inmunidad y ausencia de toxicidad. Los primeros estudios se han publicado a finales de 2004 por la Universidad de Oxford. Estos primeros ensayos tratan de aumentar la inmunidad de BCG, en individuos previamente vacunados, utilizando virus recombinantes derivados del virus de la vacuna y que contienen el antígeno de tuberculosis (Ag85) con la idea de mejorar la protección de BCG.

Desarrollo de vacunas vivas capaces de reemplazar a BCG

El desarrollo de una nueva vacuna con mayor grado de protección, que pueda sustituir la actual BCG, es un reto para la comunidad científica que permitiría el plantearse erradicar la tuberculosis a medio plazo y reemplazar la actual BCG^[30]. Nuevos candidatos vacuna, que hagan posible erradicar la tuberculosis en áreas endémicas, han de conferir una protección superior a la de BCG, en las formas de tuberculosis respiratoria en adultos, teniendo en cuenta la población coinfectada con VIH y que puedan ser producidas a gran escala y bajo coste. Para este objetivo, las vacunas vivas se plantean como buenos candidatos potenciales.

El pasado año, la primera vacuna viva contra tuberculosis que ha pasado a Fase I se basa en la actual vacuna BCG, a la que por ingeniería genética se le ha introducido una proteína recombinante (Ag85), desarrollada por un grupo americano de la Universidad de UCLA.

DESARMAR AL BACILO DE LA TUBERCULOSIS. ELECCIÓN DE LA ESTRATEGIA

La estrategia elegida por el Grupo de Trabajo de la Universidad de Zaragoza, en colaboración con el Instituto Pasteur, para la construcción de una nueva vacuna contra la tuberculosis, ha sido —a partir del conocimiento del bacilo y del desarrollo de las herramientas genéticas para su manipulación— partir de una cepa de tuberculosis, construir una nueva vacuna eliminando genes de forma racional. Una estrategia similar, pero utilizando distintos genes, es la elegida por el otro grupo pionero en genética de micobacterias el «Albert Einstein Institut» de Nueva York.

Empezar desde el principio de una forma racional con la tecnología y conocimiento actuales ¿Qué genes elegir?

Nos planteamos construir una nueva vacuna viva, a partir de un bacilo aislado de un paciente y que inactivemos sus genes de virulencia de forma racional. Esta estrategia es más laboriosa, implica partir de cero y demostrar, en una primera etapa, la atenuación del candidato a vacuna construido y, en segundo lugar, una inmunidad superior a BCG, con el ambicioso objetivo de reemplazar a la actual BCG.

Nuestra hipótesis de partida tuvo su origen en nuestros estudios sobre epidemiología molecular de cepas multirresistentes, si sólo unas pocas se transmiten de una forma mayor que el resto, éstas poseen alguna característica que les hace aumentar su virulencia. Por lo tanto, si logramos saber cómo aumentan su virulencia, podremos inactivar estos genes para disminuir su virulencia.

Tras las investigaciones de epidemiología molecular de tuberculosis multirresistentes en nuestro país, concentramos nuestros estudios en la cepa causante del mayor brote^[48] y encontramos que un gen anotado como posible regulador de genes de virulencia en el genoma de *M. tuberculosis* descrito por Cole, estaba altamente expresado en esta cepa^[51], por lo que su inactivación podría disminuir la virulencia del bacilo de la tuberculosis.

En un aislamiento clínico de tuberculosis inactivamos únicamente el gen denominado *phoP*, por las técnicas de ingeniería genética desarrolladas^[41]. La inactivación de este único gen conducía a una enorme atenuación, tanto en el modelo celular, como en el modelo ratón^[41]. Estudios posteriores de atenuación han demostrado una mayor atenuación que BCG en modelo ratón con sistema inmunológico disminuido^[34].

Hoy sabemos que el gen *phoP* regula gran número de genes del bacilo de la tuberculosis, implicado en la virulencia, entre ellos lípidos complejos, relacionados con la virulencia, que serían la base de su gran atenuación^[18].

Los ensayos de protección realizados en colaboración con equipos nacionales e internacionales de Inglaterra, Francia y Méjico, contra la infección por el bacilo de la tuberculosis han mostrado muy buenos resultados en modelo ratón, y en modelo cobayo una protección superior a BCG, con una inmunidad mayor que la actual vacuna BCG^[34]. La mayor inmunidad conferida por el mutante *phoP* está en estudio. Ensayos con primates, que se están realizando en el PBRC de Holanda, muestran resultados muy esperanzadores.

Ensayos del prototipo de vacuna hacia el ensayo clínico en humanos

Los buenos resultados en fase preclínica de este candidato a vacuna, construido de forma racional por la inactivación de genes que regulan la virulencia, hacen del mutante *phoP* un prometedor candidato a vacuna y apuntan a su futuro ensayo en humanos. Uno de los principales retos de las vacunas vivas es su absoluta seguridad para su uso en humanos. Una vez demostrada su atenuación y protección, en ambos casos mejor que la actual vacuna BCG, estamos trabajando en una nueva generación de vacuna basada en el mutante *phoP*, añadiendo una nueva mutación que aumente su seguridad.

Los futuros retos de la investigación en nuevas vacunas contra la tuberculosis

La vacunación contra la tuberculosis plantea grandes retos. Un tercio de la población mundial está infectado con el bacilo de la tuberculosis y, recientemente, los estudios de epidemiología molecular de la tuberculosis han comprobado que la reinfección

con nuevas cepas es más frecuente de lo que inicialmente se pensaba, por lo tanto, se necesitan vacunas más eficaces que la propia infección del bacilo^[30]. Las vacunas vivas atenuadas de forma racional por la inactivación de genes que regulan la virulencia están siendo un prometedor candidato a vacuna.

El desarrollo de una nueva vacuna con mayor grado de protección, que pueda sustituir la actual BCG, es actualmente un reto para la comunidad científica, que permitiría, plantearse erradicar la tuberculosis a medio plazo.

Otro reto en la vacunación contra la tuberculosis es proteger a la población que actualmente está vacunada con BCG o infectada con *M. tuberculosis*^[31]. Recientes experimentos, utilizando vacunas de subunidades proteicas, en animales previamente vacunados con BCG, están dando buenos resultados.

Las vacunas vivas derivadas de un mutante *phoP* en una cepa de tuberculosis construida de forma racional, se encuentran en avanzados ensayos preclínicos. Con el horizonte de erradicar la tuberculosis, las vacunas vivas atenuadas son buenas candidatas por su bajo coste de producción, así como por la enorme experiencia acumulada, tanto en el uso de BCG como en su producción.

Sirva nuestra modesta aportación científica en la investigación internacional dirigida a la «lucha contra la tuberculosis», que presentamos en honor a nuestro patrón San Braulio, como contribución de nuestra Universidad, que hoy se suma a la «Unión Internacional contra la Tuberculosis» y a la «Organización Mundial de la Salud», en la celebración del «Día Mundial de la Lucha contra la Tuberculosis».

Carlos Martín
Catedrático de Microbiología
Universidad de Zaragoza

Referencias

1. Aínsa, J. A., M. C. Blokpoel, I. Ota, D. B. Young, K. A. De Smet, and C. Martín. 1998. Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 180: 5836-43.
2. Aínsa, J. A., C. Martín, M. Cabeza, F. De la Cruz, and M. V. Mendiola. 1996. Construction of a family of *Mycobacterium/Escherichia coli* shuttle vectors derived from pAL5000 and pACYC184: their use for cloning an antibiotic-resistance gene from *Mycobacterium fortuitum*. *Gene* 176: 23-6.
3. Aínsa, J. A., C. Martín, B. Gicquel, and R. Gómez-Lus. 1996. Characterization of the chromosomal aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase gene from *Mycobacterium fortuitum*. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2350-5.
4. Aínsa, J. A., E. Pérez, V. Pelicic, F. X. Berthet, B. Gicquel, and C. Martín. 1997. Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase genes are universally present in mycobacteria: characterization of the *aac(2')-Ic* gene from *Mycobacterium tuberculosis* and the *aac(2')-Id* gene from *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* 24: 431-41.
5. Brosch, R., S. V. Gordon, M. Marmiesse, P. Brodin, C. Buchrieser, K. Eiglmeier, T. Garnier, C. Gutiérrez, G. Hewinson, K. Kremer, L. M. Parsons, A. S. Pym, S. Samper, D. van Soolingen, and S. T. Cole. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 3684-9.
6. Cacho Calvo, J., J. Astray Mochales, A. Pérez Meixeira, A. Ramos Martos, M. Hernando García, M. Sanchez Concheiro, J. R. Domínguez Pérez, A. B. Gómez, S. Samper, and C. Martín. 2005. Ten-year population-based molecular epidemiological study of tuberculosis transmission in the metropolitan area of Madrid, Spain. *Int J Tuberc Lung Dis* 9: 1236-41.
7. Caminero, J. A., M. J. Pena, M. I. Campos-Herrero, J. C. Rodríguez, O. Alfonso, C. Martín, J. M. Pavón, M. J. Torres, M. Burgos, P. Cabrera, P. M. Small, and D. A. Enarson. 2001. Exogenous reinfection with tuberculosis on a European island with a moderate incidence of disease. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 717-20.
8. Caminero, J. A., M. J. Pena, M. I. Campos-Herrero, J. C. Rodríguez, I. García, P. Cabrera, C. Lafoz, S. Samper, H. Takiff, O. Alfonso, J. M. Pavón, M. J. Torres, D. van Soolingen, D. A. Enarson, and C. Martín. 2001. Epidemiological evidence of the spread of a *Mycobacterium tuberculosis* strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1165-70.

9. Codina, G., R. Vidal, N. Martín-Casabona, M. Miravittles, and C. Martín. 1999. Multidrug-resistant tuberculosis caused by 'W'-related strains in three immunocompetent foreign-born patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 3: 82-4.
10. De Rossi, E., J. A. Aínsa, and G. Riccardi. 2006. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiol Rev* 30: 36-52.
11. De Rossi, E., P. Arrigo, M. Bellinzoni, P. A. Silva, C. Martín, J. A. Aínsa, P. Gugliera, and G. Riccardi. 2002. The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Med* 8: 714-24.
12. Dorronsoro, I., C. Martín, B. Cabodevilla, M. Ojer, and A. Ruiz. 2000. Effect of the number of samples studied on the diagnosis of tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 18: 215-8.
13. García, M. J., C. Guillhot, R. Lathigra, M. C. Menéndez, P. Doménech, C. Moreno, B. Gicquel, and C. Martín. 1994. Insertion sequence IS1137, a new IS3 family element from *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* 140 (Pt 10): 2821-8.
14. García, M. R., J. C. Rodríguez, J. F. Navarro, S. Samper, C. Martín, and G. Royo. 2002. Molecular epidemiology of tuberculosis in Elche, Spain: a 7-year study. *J Med Microbiol* 51: 273-7.
15. Gavigan, J. A., J. A. Aínsa, E. Pérez, I. Otal, and C. Martín. 1997. Isolation by genetic labeling of a new mycobacterial plasmid, pJAZ38, from *Mycobacterium fortuitum*. *J Bacteriol* 179: 4115-22.
16. Gavigan, J. A., C. Guillhot, B. Gicquel, and C. Martín. 1995. Use of conjugative and thermosensitive cloning vectors for transposon delivery to *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol Lett* 127: 35-9.
17. Gavigan, J. A., and C. Martín. 1998. Conjugating DNA into mycobacteria. *Methods Mol Biol* 101: 119-28.
18. Gonzalo Asensio, J., C. Maia, N. L. Ferrer, N. Barilone, F. Laval, C. Y. Soto, N. Winter, M. Daffe, B. Gicquel, C. Martín, and M. Jackson. 2006. The virulence-associated two-component PhoP-PhoR system controls the biosynthesis of polyketide-derived lipids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 281: 1313-1316.
19. Gortázar, C., J. Vicente, S. Samper, J. M. Garrido, I. G. Fernández-De-Mera, P. Gavín, R. A. Juste, C. Martín, P. Acevedo, M. De la Puente, and U. Hofle. 2005. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in south-central Spain. *Vet Res* 36: 43-52.

20. Guilhot, C., B. Gicquel, J. Davies, and C. Martín. 1992. Isolation and analysis of IS6120, a new insertion sequence from *Mycobacterium smegmatis*. Mol Microbiol 6: 107-13.
21. Guilhot, C., B. Gicquel, and C. Martín. 1992. Temperature-sensitive mutants of the *Mycobacterium* plasmid pAL5000. FEMS Microbiol Lett 77: 181-6.
22. Guilhot, C., I. Otal, I. Van Rompaey, C. Martín, and B. Gicquel. 1994. Efficient transposition in mycobacteria: construction of *Mycobacterium smegmatis* insertional mutant libraries. J Bacteriol 176: 535-9.
23. Gutiérrez, M., S. Samper, J. A. Gavigan, J. F. García Marín, and C. Martín. 1995. Differentiation by molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains causing tuberculosis in cattle and goats. J Clin Microbiol 33: 2953-6.
24. Gutiérrez, M., S. Samper, M. S. Jiménez, J. D. Van Embden, J. F. Marín, and C. Martín. 1997. Identification by spoligotyping of a caprine genotype in *Mycobacterium bovis* strains causing human tuberculosis. J Clin Microbiol 35: 3328-30.
25. Hermans, J., C. Martín, G. N. Huijberts, T. Goosen, and J. A. de Bont. 1991. Transformation of *Mycobacterium aurum* and *Mycobacterium smegmatis* with the broad host-range gram-negative cosmid vector pJRD215. Mol Microbiol 5: 1561-6.
26. Iglesias M.J. Epidemiología molecular de la tuberculosis en Zaragoza 1993-1995. 1998. Tesis Doctoral Universidad de Zaragoza.
27. Iglesias M.J., Rabanaque M.J., and L.I. Gómez-López 2002. La tuberculosis en la provincia de Zaragoza. Estimación mediante el método captura recaptura. Revista Clínica Española 202 : 249-254
28. Jackson, M., F. X. Berthet, I. Otal, J. Rauzier, C. Martín, B. Gicquel, and C. Guilhot. 1996. The *Mycobacterium tuberculosis* purine biosynthetic pathway: isolation and characterization of the *purC* and *purL* genes. Microbiology 142 (Pt 9): 2439-47.
29. Kremer, K., D. Van Soolingen, R. Frothingham, W. H. Haas, P. W. Hermans, C. Martín, P. Palittapongarnpim, B. B. Plikaytis, L. W. Riley, M. A. Yakrus, J. M. Musser, and J. D. Van Embden. 1999. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis complex* strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. J Clin Microbiol 37: 2607-18.
30. Martín, C. 2005. The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG? Eur Respir J 26: 162-7.
31. Martín, C. 2006. Tuberculosis vaccines: Past, Present and Future. Current Opinion in Pulmonary Medicine in press.

32. Martín, C., P. Mazodier, M.V. Mediola, B. Gicquel, T. Smokvina, C. J. Thompson, and J. Davies. 1991. Site-specific integration of the *Streptomyces* plasmid pSAM2 in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* 5: 2499-502.
33. Martín, C., J. Timm, J. Rauzier, R. Gómez-Lus, J. Davies, and B. Gicquel. 1990. Transposition of an antibiotic resistance element in mycobacteria. *Nature* 345: 739-43.
34. Martín, C., A. Williams, R. Hernández-Pando, P.J. Cardona, E. Gormley, Y. Bordat, C. Y. S. , S. O. Clark, G. J. Hatch, D. Aguilar, V. Ausina, and B. Gicquel. 2006. The live *Mycobacterium tuberculosis* *phoP* mutant strain is more attenuated than BCG and confers protective immunity against tuberculosis in mice and guinea pigs. *Vaccine*. In press.
35. Mendiola, M.V., C. Martín, I. Ota, and B. Gicquel. 1992. Analysis of the regions responsible for IS6110 RFLP in a single *Mycobacterium tuberculosis* strain. *Res Microbiol* 143: 767-72.
36. Mostowy, S., J. Inwald, S. Gordon, C. Martín, R. Warren, K. Kremer, D. Cousins, and M. A. Behr. 2005. Revisiting the evolution of *Mycobacterium bovis*. *J Bacteriol* 187: 6386-95.
37. Ota, I., C. Martín, V. Vincent-Levy-Frebault, D. Thierry, and B. Gicquel. 1991. Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in tuberculosis. *J Clin Microbiol* 29: 1252-4.
38. Ota, I., S. Samper, M. P. Asensio, M. A. Vitoria, M. C. Rubio, R. Gómez-Lus, and C. Martín. 1997. Use of a PCR method based on IS6110 polymorphism for typing *Mycobacterium tuberculosis* strains from BACTEC cultures. *J Clin Microbiol* 35: 273-7.
39. Peña, M. J., J. A. Caminero, M. I. Campos-Herrero, J. C. Rodríguez-Gallego, M. I. García-Laorden, P. Cabrera, M. J. Torres, B. Lafarga, F. Rodríguez de Castro, S. Samper, F. Cañas, D. A. Enarson, and C. Martín. 2003. Epidemiology of tuberculosis on Gran Canaria: a 4 year population study using traditional and molecular approaches. *Thorax* 58: 618-22.
40. Pérez, E., J. A. Gavigan, I. Ota, C. Guilhot, V. Pelicic, B. Gicquel, and C. Martín. 1998. Tn611 transposon mutagenesis in *Mycobacterium smegmatis* using a temperature-sensitive delivery system. *Methods Mol Biol* 101: 187-98.
41. Pérez, E., S. Samper, Y. Bordas, C. Guilhot, B. Gicquel, and C. Martín. 2001. An essential role for *phoP* in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Mol Microbiol* 41: 179-87.

42. Rad, M. E., P. Bifani, C. Martín, K. Kremer, S. Samper, J. Rauzier, B. Kreiswirth, J. Blázquez, M. Jouan, D. van Soolingen, and B. Gicquel. 2003. Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family. *Emerg Infect Dis* 9: 838-45.
43. Ramón-García, S., C. Martín, J. A. Aínsa, and E. De Rossi. 2006. Characterization of tetracycline resistance mediated by the efflux pump Tap from *Mycobacterium fortuitum*. *J Antimicrob Chemother* 57: 252-9.
44. Rivero, A., M. Márquez, J. Santos, A. Pinedo, M. A. Sánchez, A. Esteve, S. Samper, and C. Martín. 2001. High rate of tuberculosis reinfection during a nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* strain B. *Clin Infect Dis* 32: 159-61.
45. Samper, S., M. J. Iglesias, M. J. Rabanaque, L. I. Gómez, M. C. Lafoz, M. S. Jiménez, A. Ortega, M. A. Lezcano, D. Van Soolingen, and C. Martín. 2005. Systematic molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from Spain. *J Clin Microbiol* 43: 1220-7.
46. Samper, S., M. J. Iglesias, M. J. Rabanaque, M. A. Lezcano, L. A. Vitoria, M. C. Rubio, R. Gómez-Lus, L. I. Gómez, I. Otal, and C. Martín. 1998. The molecular epidemiology of tuberculosis in Zaragoza, Spain: a retrospective epidemiological study in 1993. *Int J Tuberc Lung Dis* 2: 281-7.
47. Samper, S., M. J. Iglesias, and O. Tello. 2000. The Spanish multidrug resistant tuberculosis network. *Euro Surveill* 5: 43-45.
48. Samper, S., C. Martín, A. Pinedo, A. Rivero, J. Blázquez, F. Baquero, D. Van Soolingen, and J. Van Embden. 1997. Transmission between HIV-infected patients of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. *AIDS* 11: 1237-42.
49. Samper, S., I. Otal, M. C. Rubio, M. A. Vitoria, R. Gómez-Lus, and C. Martín. 1993. Application of RFLP to typing strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 11: 547-51.
50. Silva, P. E., F. Bigi, M. de la Paz Santangelo, M. I. Romano, C. Martín, A. Cataldi, and J. A. Aínsa. 2001. Characterization of P55, a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 800-4.
51. Soto, C. Y., M. C. Menéndez, E. Pérez, S. Samper, A. B. Gómez, M. J. García, and C. Martín. 2004. IS6110 mediates increased transcription of the *phoP* virulence gene in a multidrug-resistant clinical isolate responsible for tuberculosis outbreaks. *J Clin Microbiol* 42: 212-9.

52. Van Embden, J. D., M. D. Cave, J. T. Crawford, J. W. Dale, K. D. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, C. Martín, R. McAdam, T. M. Shinnick, and *et al.* 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 31: 406-9.
53. Williams, A., G. J. Hatch, S. O. Clark, K. E. Gooch, K. A. Hatch, G. A. Hall, K. Huygen, T. H. Ottenhoff, K. L. Franken, P. Andersen, T. M. Doherty, S. H. Kaufmann, L. Grode, P. Seiler, C. Martín, B. Gicquel, S. T. Cole, P. Brodin, A. S. Pym, W. Dalemans, J. Cohen, Y. Lobet, N. Goonetilleke, H. McShane, A. Hill, T. Parish, D. Smith, N. G. Stoker, D. B. Lowrie, G. Kallenius, S. Svenson, A. Pawlowski, K. Blake, and P. D. Marsh. 2005. Evaluation of vaccines in the EU TB Vaccine Cluster using a guinea pig aerosol infection model of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 85: 29-38.
54. Zumárraga, M. J., A. Bernardelli, R. Bastida, V. Quse, J. Loureiro, A. Cataldi, F. Bigi, A. Alito, M. Castro Ramos, S. Samper, I. Otal, C. Martín, and M. I. Romano. 1999. Molecular characterization of mycobacteria isolated from seals. *Microbiology* 145 (Pt 9): 2519-26.
55. Zumárraga, M. J., C. Martín, S. Samper, A. Alito, O. Latini, F. Bigi, E. Roxo, M. E. Cicuta, F. Errico, M. C. Ramos, A. Cataldi, D. Van Soolingen, and M. I. Romano. 1999. Usefulness of spoligotyping in molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*-related infections in South America. *J Clin Microbiol* 37: 296-303.

Direcciones con información de interés

WHO. Global Report tuberculosis. Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing. World Health Organization, Geneva, 2005. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html.

WHO/IUATLD. Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World. Report no. 3: prevalence and trends. WHO/IUATLD. Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance 1999-2002. World Health Organization and International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, Geneva, 2004. http://www.who.int/tb/publications/who_htm_tb_2004_343/en/index.html.

Grupo de Genética de Micobacterias <http://genmico.unizar.es/>

ÍNDICE

LOS MICROBIOS Y LAS ENFERMEDADES	5
APUNTES HISTÓRICOS SOBRE LA TUBERCULOSIS	6
SITUACIÓN ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS EN EL MUNDO	8
LA ESTRATEGIA DEL BACILO DE LA TUBERCULOSIS.....	9
LA ESTRATEGIA DEL INVESTIGADOR: PRIMERO ESTUDIAR PARA LUEGO PODER DESACTIVAR AL BACILO	10
Estudiando al bacilo	10
Epidemiología Molecular de la Tuberculosis: Siguiendo el rastro del bacilo de la tuberculosis	10
Estudios de Epidemiología Molecular en nuestra Comunidad Autónoma	12
Estudios de Epidemiología Molecular a nivel nacional e internacional.	13
Estudio de los mecanismos de adaptación del bacilo a los fármacos antituberculosos: Estudio de los mecanismos de resistencia	14
Epidemiología molecular de la tuberculosis multirresistente	15
Estudio de la tuberculosis multirresistente a nivel nacional.....	16
Estudio de la tuberculosis multirresistente a nivel internacional....	17
Desarrollo de herramientas genéticas para estudiar el bacilo de la tuberculosis.....	17
EL SUEÑO DE UNA NUEVA VACUNA CONTRA LA TUBERCULOSIS	20
La experiencia de vacuna viva BCG	20
Mejorar la eficacia de la actual vacuna BCG	21
Desarrollo de vacunas vivas capaces de reemplazar a BCG	22

DESARMAR AL BACILO DE LA TUBERCULOSIS. ELECCIÓN DE LA ESTRATEGIA	22
Empezar desde el principio de una forma racional con la tecnología y conocimiento actuales ¿Qué genes elegir?	23
Ensayos del prototipo de vacuna hacia el ensayo clínico en humanos	24
Los futuros retos de la investigación en nuevas vacunas contra la tuberculosis.....	24
Referencias	27
Direcciones con información de interés	32

