



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA

Departament de Microbiologia i Ecologia

Programa Doctorat: 3139 Medicina

**“Tuberculosis en el Departamento de Salud Valencia-
Doctor Peset. Aportación de los Métodos de
Microbiología Molecular”**

TESIS DOCTORAL

Presentada por: **Ester Colomer Roig**

Licenciatura de Ciencias Biológicas

Valencia, Julio 2018

Secció Departamental de Microbiologia



**“Tuberculosis en el Departamento de Salud
Valencia- Doctor Peset. Aportación de los Métodos de
Microbiología Molecular”**

Autora: Ester Colomer Roig
Licenciatura de Ciencias Biológicas

Directores: Dr. Juan José Camarena Miñana
Dr. José Miguel Nogueira Coito

Valencia, Julio 2018

INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

Director (es) / Codirector (es):

1.- Apellidos y nombre: JUAN JOSÉ CAMARENA MIÑANA N.I.F. 19986708-F
Departamento/Instituto: Microbiología y Ecología Centro: Facultad de Medicina/
Hospital Universitario Dr. Peset- Universitat de València

2.- Apellidos y nombre: JOSÉ MIGUEL NOGUEIRA COITO N.I.F. 19822439- G
Departamento/Instituto: Microbiología y Ecología Centro: Facultad de Medicina/
Hospital Universitario Dr. Peset- Universitat de València

Directores/as de la tesis doctoral: **“Tuberculosis en el Departamento de Salud Valencia Doctor- Peset. Aportación de los Métodos de Microbiología Molecular”**

de D/Dña. ESTER COLOMER ROIG,

estudiante del Programa de Doctorado 3139 Medicina (RD99/2011) en Medicina de la Universitat de València, emiten informe FAVORABLE para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: València, 9 de Julio de 2018

Fdo.: Juan José Camarena Miñana

Fdo.: José Miguel Nogueira Coito

**ESCUELA DOCTORAL
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis doctoral no hubiese sido posible sin todas aquellas personas que han colaborado y apoyado este proyecto y a quienes quiero expresar mi gratitud por su ayuda y la confianza que han depositado en mí.

En primer lugar, a mis directores de Tesis, los Dr. Juan José Camarena y José Miguel Nogueira. Mi más sincero agradecimiento por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo, que ha sido posible con su paciencia, su entrega y sus valiosos consejos.

Tampoco me quiero olvidar del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Doctor Peset, sobre todo de sus residentes, que desde el primer día me han acogido como una integrante más de su equipo. Y en especial quiero dar las gracias a la Dr. Rosa González, que siempre ha estado ahí.

Me gustaría también agradecer a todo el grupo de la Unidad de Genómica de Tuberculosis su colaboración y su gran implicación en este proyecto. Muy especialmente al Dr. Iñaki Comas, Irving y Luis, que tanto me han enseñado durante mi estancia.

Por último, quiero acordarme de mis amigos y de todas aquellas personas que me han acompañado a lo largo de este duro camino. Gracias por aguantarme y escucharme en los buenos y en los malos momentos. Y por supuesto, mi más profundo agradecimiento a mi familia, en especial a mis padres y a mi hermano, por su ejemplo de lucha, honestidad y superación. Todo esto no hubiera sido posible sin su ayuda, su cariño y su apoyo incondicional a lo largo de todos estos años...por ellos y para ellos!!!

Resumen:

La tuberculosis (TB) se mantiene como problema importante de salud pública a pesar de la disminución progresiva de su incidencia en nuestro medio. Los programas de control deben incluir objetivos de mejora en detección precoz de pacientes bacilíferos y la eficacia y rapidez de los métodos de rutina microbiológica para identificación y sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* complex, detectando cepas multirresistentes (MDR-TB) de forma rápida y sencilla.

En este trabajo se describe el modelo de funcionamiento del Servicio de Microbiología en la detección y control de las TB del Departamento de Salud Valencia- Dr. Peset en los últimos once años, calculando la evolución de tasas de incidencia de TB, influencia de variables demográficas y factores de riesgo (coinfección VIH, inmigración y localización del cuadro). Se estudia la eficacia de la implantación en rutina microbiológica de los métodos moleculares disponibles actualmente en la demora de diagnóstico de caso y detección de resistencias (inmunocromatografía, PCR hibridación, PCR en tiempo real y secuenciación).

En el Departamento de Salud Valencia- Dr. Peset se detectó en el periodo 2005- 2015 una media de 43 casos/ año de TB (incidencia media $11,6 \times 10^5$ hab.) con disminución progresiva por años. El estudio de las características demográficas y de factores de riesgo nos ofrece un perfil de paciente varón, entre 25- 55 años y/ o mayor de 75 años, con afectación mayoritariamente pulmonar, autóctono en un 64% de los casos y VIH negativo. Un 37,3% fueron inmigrantes (predominio de América del Sur- 43%, seguido de África- 28% y de Europa- 22%). En un 10,2% se asoció coinfección por VIH, con un 27,1% de pacientes en los que no se les solicitó determinación de Ac anti- VIH. No se detectaron coinfecciones TB- VIH en pacientes pediátricos ni en mayores de 65 años. Un 77,4% fueron TB pulmonares. Más de la mitad (52,5%) de los casos de TB confirmados fueron pacientes remitidos desde el Servicio de Urgencias Médicas del Hospital. La rentabilidad de la baciloscopia fue inferior en casos extrapulmonares y en VIH+. No se demostraron diferencias significativas en la asociación TB con inmigración y/ o coinfección VIH.

La introducción en la rutina diagnóstica de las técnicas de detección rápida y/ o moleculares conllevó un descenso progresivo de la demora diagnóstica, llegando hasta 3- 4 días en el 75% o incluso a <24h en casi el 60% de los casos. La tasa de MDR-TB fue del 1,9%, sin diferencias entre año de estudio, edad, sexo, nacionalidad ni coinfección VIH de los casos. Sin embargo, el 6% presentaban resistencia a isoniacida. La detección de resistencia a rifampicina mediante PCR en tiempo real contribuyó a la detección precoz (menos de 3h) de todos los casos MDR-TB. Se aplicó la secuenciación genómica en las cepas MDR-TB pudiendo así determinar su linaje, coexistencia de poblaciones, mecanismos de transmisión y resistencias por mutaciones no detectables con métodos convencionales.

Palabras clave: tuberculosis, diagnóstico microbiológico, técnicas moleculares, resistencias, demora diagnóstica, departamento de salud, incidencia, inmigración, coinfección VIH.

Abstract:

The tuberculosis (TB) remains as an important problem of public health despite the progressive decrease of his incidence in our society. The control programs should include targets of improvement in precocious detection of smear-positive patients, and the efficiency and promptness of the methods of microbiological routine for identification and sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* complex, detecting multidrug-resistant strains (MDR-TB) in a fast and simple way.

In this study it is described the model of operation of the Service of Microbiology in the detection and control of the TB of the Health Department of Valencia- Dr. Peset in the last eleven years, calculating the evolution of incidence taxes of TB, influence of demographic variables and factors of risk (HIV coinfection, immigration and TB location). It studies the efficiency of the implantation in microbiological routine of the available molecular methods at present in the delay of diagnostic of case and detection of resistances (immunochromatography, PCR hybridisation, Real-Time PCR and sequencing).

In the Health Department of Valencia- Dr. Peset were detected between 2005- 2015 an average of 43 cases/ year of TB (half incidence $11,6 \times 10^5$ hab.) with progressive decrease by years. The study of the demographic characteristics and factors of risk offers us a patient profile consisted of a man, between 25- 55 years old and/ or older than 75 years old, with affectation mostly pulmonary, autochthonous in 64% of the cases and negative HIV. A 37,3% were immigrant (predominance from South America- 43%, followed of Africa- 28% and of Europe- 22%). In a 10,2% were associated a coinfection by HIV, with 27,1% of patients in which was not requested a determination of Ac anti- HIV. We're not detected TB- HIV coinfections in pediatric patients neither in older than 65 years old. 77,4% were pulmonary TB. More than half (52,5%) of the confirmed cases of TB were patients remitted from the Service of Medical Urgencies of the Hospital. The profitability of the smear y was inferior in extrapulmonary cases and in HIV+. They did not show significant differences in the association TB with immigration and/ or HIV coinfection.

The introduction in the diagnostic routine of the fast detection and/ or molecular techniques comported a progressive decrease of the diagnostic delay, arriving until 3- 4 days in 75% or even to <24h in almost 60% of the cases. The tax of MDR-TB was of 1,9%, without differences between year of study, age, sex, nationality neither HIV coinfection of the cases. However, the 6% presented resistance to isoniazid. The detection of resistance to rifampicin by means of PCR in real time contributed to the precocious detection (less than 3h) of all the cases MDR-TB. It was applied the genomic sequencing in the cases MDR-TB being able to determine his lineage, coexistence of populations, mechanisms of transmission and resistances by no sequencing mutations with conventional methods.

Keywords: tuberculosis, microbiological diagnosis, molecular technicians, resistances, diagnostic delay, department of health, incidence, immigration, HIV coinfection.

Resum:

La tuberculosi (TB) es manté com a problema important de salut pública malgrat la disminució progressiva de la seua incidència en el nostre medi. Els programes de control han d'incloure objectius de millora en detecció precoç de pacients bacil·lífers i rapidesa dels mètodes de rutina microbiològica per a identificació i sensibilitat de *Mycobacterium tuberculosis* complex, detectant soques multirresistents (MDR-TB) de forma ràpida i senzilla.

En aquest treball es descriu el model de funcionament del Servei de Microbiologia en la detecció i control de les TB del Departament de Salut València- Dr. Peset en els últims onze anys, calculant l'evolució de taxes d'incidència de TB, influència de variables demogràfiques i factors de risc (coïnfecció VIH, immigració i localització del quadre). S'estudia l'eficàcia de la implantació en rutina microbiològica dels mètodes moleculars disponibles actualment en la demora de diagnòstic de cas i detecció de resistències (immunocromatografia, PCR hibridació, PCR en temps real i seqüenciació).

En el Departament de Salut València- Dr. Peset es va detectar en el període 2005- 2015 una mitjana de 43 casos/ any de TB (incidència mitjana $11,6 \times 10^5$ hab.) amb disminució progressiva per anys. L'estudi de les característiques demogràfiques i de factors de risc ens ofereix un perfil de pacient home, entre 25- 55 anys i/ o major de 75 anys, amb afectació majoritàriament pulmonar, autòcton en un 64% dels casos i VIH negatiu. Un 37,3% van ser immigrants (predomini d'Amèrica del Sud- 43%, seguit d'Àfrica- 28% i d'Europa- 22%). En un 10,2% es va associar coïnfecció per VIH, amb un 27,1% de pacients en els quals no se'ls va sol·licitar determinació de Ac anti- VIH. No es van detectar coïnfecions TB- VIH en pacients pediàtrics ni en majors de 65 anys. Un 77,4% van ser TB pulmonars. Més de la meitat (52,5%) dels casos de TB confirmats van ser pacients remesos des del Servei d'Urgències Mèdiques de l'Hospital. La rentabilitat de la bacil·loscòpia va ser inferior en casos extrapulmonars i en VIH+. No es van demostrar diferències significatives en l'associació TB amb immigració i/ o coïnfecció VIH.

La introducció en la rutina diagnòstica de les tècniques de detecció ràpida i/ o moleculars va comportar un descens progressiu de la demora diagnòstica, arribant fins a 3- 4 dies en el 75% o fins i tot a <24h en quasi el 60% dels casos. La taxa de MDR-TB va ser de l'1,9%, sense diferències entre any d'estudi, edat, sexe, nacionalitat ni coïnfecció VIH dels casos. No obstant, el 6% presentaven resistència a isoniacida. La detecció de resistència a rifampicina mitjançant PCR en temps real va contribuir a la detecció precoç (menys de 3h) de tots els casos MDR-TB. Es va aplicar la seqüenciació genòmica en les soques MDR-TB podent així determinar el seu llinatge, coexistència de poblacions, mecanismes de transmissió i resistències per mutacions no detectables amb mètodes convencionals.

Paraules clau: tuberculosi, diagnòstic microbiològic, tècniques moleculars, resistències, demora diagnòstica, departament de salut, incidència, immigració, coïnfecció VIH.

Índice

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- La tuberculosis en nuestro medio y su entorno. Situación actual.....	1.1
1.1.1.- Situación de la TB en Europa.....	1.4
1.1.2.- Situación de la TB en España y en la Comunitat Valenciana.....	1.6
1.1.2.1.- Datos de TB en España.....	1.6
1.1.2.2.- Datos de TB en la Comunitat Valenciana.....	1.10
1.2.- Tuberculosis: factores de riesgo y formas de prevención.....	1.12
1.2.1.- Aspectos patogénicos.....	1.12
1.2.2.- Factores asociados.....	1.13
1.2.3.- Formas de presentación.....	1.14
1.3.- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex como agente etiológico de la tuberculosis.....	1.16
1.3.1.- Aspectos microbiológicos y diferenciación de especie.....	1.16
1.4.- El diagnóstico microbiológico de confirmación de TB. Pautas a aplicar desde el Servicio de Microbiología.....	1.18
1.4.1.- Utilidad de la baciloscopia. Un método que se mantiene.....	1.20
1.4.2.- Técnicas de cultivo. De la siembra en Löwenstein- Jensen a los actuales sistemas automatizados en medio líquido.....	1.21
1.4.3.- Identificación de especie aplicando técnicas rápidas y/ o moleculares...	1.23
1.5.- Estudios de sensibilidad de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex. Una necesidad pautable.....	1.25
1.5.1.- Métodos fenotípicos de sensibilidad a tuberculostáticos y su vigencia...	1.28
1.5.2.- Métodos moleculares y resistencia a tuberculostáticos: inclusión en las pautas.....	1.29
1.5.3.- Aplicación de la secuenciación genómica en <i>M. tuberculosis</i>	1.43
2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	2.1

3.-MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Diseño y ámbito del estudio	3.1
3.2.- Variables en las definiciones y caracterización de casos del estudio	3.3
3.2.1.- Definiciones de caso de TB.....	3.3
3.2.2.- Tipos de TB. Clasificación según variables aplicadas.....	3.4
3.3.- Datos oficiales de TB declaradas	3.9
3.4.- Diagnóstico y confirmación microbiológica de <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>	3.9
3.4.1.- Procesamiento de muestras.....	3.10
3.4.2.- Tipos de muestras.....	3.11
3.4.3.- Valoración microscópica de las muestras y baciloscopia.....	3.12
3.4.4.- Procedimientos para descontaminación y siembra de las muestras.....	3.13
3.4.5.- Pauta de identificación feno- genotípica de especie micobacteriana.....	3.15
3.4.5.1.- Identificación por métodos convencionales.	3.16
3.4.5.1.1.- Características físicas y bioquímicas del crecimiento en LJ.....	3.16
3.4.5.1.2.- Identificación por métodos rápidos moleculares y de detección antigénica.....	3.18
3.5.- Detección directa desde muestra de paciente de ADN de <i>M. tuberculosis complex</i>. PCR en tiempo real (GeneXpert MTB/RIF Cepheid®) ..	3.26
3.6.- Estudio de sensibilidad a tuberculostáticos	3.30
3.6.1.- Microbiograma para <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> . Método automatizado BACTEC- MGIT 960®.....	3.30
3.6.2.- Identificación molecular de resistencia de <i>M. tuberculosis complex</i> mediante métodos genotípicos convencionales (HAIN LifeScience).....	3.34
3.6.2.1.- Confirmación molecular para la detección de resistencias a rifampicina y/ o isoniacida mediante el GenoType MTBDR _{plus} ®.....	3.34
3.6.2.2.- Confirmación molecular para la detección de resistencias a fluoroquinolonas, aminoglicósidos y/ o etambutol mediante el GenoType MTBDRs/ V.1.0®.....	3.39
3.6.2.3.- Confirmación molecular para la detección de resistencias a fluoroquinolonas y/ o aminoglicósidos mediante el GenoType MTBDRs/ V.2.0®.....	3.42
3.7.- Secuenciación de cepas MDR-TB mediante MiSeq de Illumina®	3.44

4.- RESULTADOS

4.1.- Tuberculosis confirmadas en el Departamento de Salud Valencia-Doctor Peset durante el periodo 2005- 2015.....	4.1
4.1.1.- Casos con aislamientos de <i>Mycobacterium</i> spp.....	4.1
4.1.2.- Incidencia de casos de TB confirmada en el área. Comparación con los datos de los informes de la Comunitat Valenciana.....	4.3
4.2.- Características de la población con tuberculosis confirmada.....	4.5
4.2.1.- Distribución por sexo y grupos de edad de los pacientes estudiados.....	4.5
4.2.2.- Distribución de casos de TB según nacionalidad. Comparación con los datos de la Comunitat Valenciana.....	4.6
4.2.3.- Distribución de casos de TB con coinfección por VIH.....	4.10
4.2.4.- Localización pulmonar/ extrapulmonar de casos de TB.....	4.11
4.2.5.- Servicio de origen de casos con diagnóstico de TB confirmada.....	4.13
4.2.6.- Pacientes con más de un episodio de TB confirmado durante el estudio.....	4.14
4.3.- Aspectos microbiológicos de las TB confirmadas.....	4.16
4.3.1.- Rentabilidad de la baciloscopia en el diagnóstico preliminar de TB.....	4.16
4.3.1.1.- Baciloscopia según localización pulmonar/ extrapulmonar de TB...	4.17
4.3.1.2.- Baciloscopia en pacientes VIH.....	4.19
4.3.2.- Aislamiento de MTB en medios de cultivo.....	4.19
4.3.3.- Identificación de especie/ cepa del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4.22
4.4.- Estudio de sensibilidad de los aislados de MTB a tuberculostáticos...	4.23
4.4.1.- Estudio de sensibilidad mediante sistema automatizado BACTEC MGIT 960 para SIRE- Pirazinamida.....	4.23
4.4.1.1.- Resistencias globales a uno o varios fármacos.....	4.24
4.4.1.2.- Estudio de cepas multirresistentes a lo largo de los años de estudio.	4.26
4.4.1.3.- Resistencias según variable demográfica del paciente.....	4.27
4.4.2.- Estudio de resistencias mediante métodos genotípicos convencionales.....	4.29
4.4.2.1.- Detección de resistencias a rifampicina y/ o isoniacida mediante el GenoType MTBDRplus®.....	4.29

4.4.2.2- Resistencias a etambutol y/ o fármacos de segunda línea mediante el GenoType MTBDRs/ V.1.0.....	4.31
4.4.2.3.- Resistencias a fármacos de segunda línea mediante el GenoType MTBDRs/ V.2.0.....	4.33
4.4.3.- Características demográficas y microbiológicas de los pacientes MDR-TB.....	4.33
4.5.- Secuenciación con MiSeq de Illumina® de aislados MDR-TB.....	4.36
4.5.1.- Linajes y Sublinajes de las cepas secuenciadas.....	4.36
4.5.2.- Secuenciación y detección de mutaciones y estudio de transmisión de cepas.....	4.37
4.6.- PCR en tiempo real para <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex sobre muestras de pacientes.....	4.51
4.6.1.- PCR en tiempo real sobre casos confirmados de tuberculosis.....	4.51
4.6.2.- PCR en tiempo real sobre casos grupo control sin tuberculosis.....	4.53
4.6.3.- Estudio de la capacidad predictiva de GeneXpert como prueba diagnóstica de tuberculosis.....	4.55
	4.62
4.7- Demora microbiológica de TB confirmada en el Departamento de Salud Valencia- Doctor Peset.....	4.56
4.7.1.- Demora microbiológica en el HUDr. Peset.....	4.56
4.7.2.- Demora diagnóstica en comparación con datos oficiales de la Conselleria de Sanitat.....	4.59
5.- DISCUSIÓN	
5.1.- Situación actual de la tuberculosis. Características de la población con TB confirmada en nuestro medio.....	5.1
5.2.- Papel del laboratorio de microbiología en la confirmación de los casos de TB, detección de resistencias y disminución de la demora diagnóstica.....	5.8
5.2.1.- Eficacia de las técnicas actuales en el diagnóstico precoz y confirmación de TB.....	5.8
5.2.2.- Detección y control de cepas de <i>M. tuberculosis</i> complex resistentes.....	5.13

5.3.- Soluciones microbiológicas a la demora diagnóstica de la TB.....	5.28
6.- CONCLUSIONES.....	6.1
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	7.1

ÍNDICE DE ABREVIATURA

A:	Adenina
Ac:	Anticuerpo
Ag:	Antígeno
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
AG- PC:	Aminoglicósidos- Péptidos cíclicos
ARN:	Ácido Ribonucleico
AEE:	Área Económica Europea
BAAR:	Bacilo Ácido Alcohol Resistente
BAL:	Lavado Broncoalveolar
BAS:	Broncoaspirado
BCG:	Bacilo de Calmette- Guerin
C:	Citosina
CAP:	Centros de Atención Primaria
CVA:	Cirugía Cardiovascular
CCAA:	Comunidades Autónomas
CDC:	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades
COT:	Cirugía Ortopédica y Traumatología
DS:	Departamento de Salud
E:	Etambutol
ECDC:	Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades
EDO:	Enfermedades de Declaración Obligatoria
ELISA:	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
FDA:	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
FISABIO:	Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana
FN:	Falso Negativo
FQ:	Fluoroquinolonas
FP:	Falso Positivo
G:	Guanina
GX:	GeneXpert
H:	Isoniacida
HC:	Historia Clínica
HPC:	Países de Alta Prioridad
HUDr. Peset:	Hospital Universitario Doctor Peset
IC:	Inmunocromatografía
IC 95%:	Intervalo de Confianza al 95%

INDELS:	Inserciones- Deleciones
LCR:	Líquido Cefalorraquídeo
LJ:	Löwenstein- Jensen
MAP:	Médico Atención Primaria
MDR-TB:	Multirresistente
MGIT:	Tubo Indicador de Crecimiento Micobacteriano
M.Int- UEI:	Medicina Interna- Unidad de Enfermedades Infecciosas
MNT:	Micobacterias No Tuberculosas
MTB:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
NC:	No Consta
Nefro- URO:	Nefrología- Urología
ODS:	Objetivos de Desarrollo Sostenible
OMS:	Organización Mundial de la Salud
ORL:	Otorrinolaringología
PAAF:	Punción Aspiración con Aguja Fina
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PICC:	Catéter Central de Inserción Periférica
Pre-XDR:	Pre- extremadamente resistente
R:	Rifampicina
RENAVE:	Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica
RT- PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real
S:	Streptomycin
SBS:	Secuenciación por Síntesis
SEIMC:	Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología
SEPAR:	Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica
SIDA:	Síndrome Inmunodeficiencia Adquirida
SIRE- P:	Streptomycin, Isoniacida, Rifampicina, Etambutol, Pirazinamida
SNC:	Sistema Nervioso Central
SNP:	Polimorfismo de un Nucleótido
STD:	Desviación Estándar
T:	Timina
TB:	Tuberculosis
TBP:	Tuberculosis Pulmonar
TBEP:	Tuberculosis Extrapulmonar
UCI:	Unidad de Cuidados Intensivos
UE:	Unión Europea
UMH:	Urgencias Médicas del Hospital
VIH:	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VN:	Verdadero Negativo
VP:	Verdadero Positivo

VPN:	Valor Predictivo Negativo
VPP:	Valor Predictivo Positivo
XDR-TB:	Extremadamente resistente
Z:	Pirazinamida
ZN:	Ziehl- Neelsen

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1.- Tasa de incidencia de casos de TB y cambio medio anual en porcentaje de las tasas en la Región Europea de la OMS entre los años 2011 y 2015.....	1.5
Tabla 1.2.- Casos de TB en la Comunitat Valenciana. Periodo 2011- 2015.....	1.11
Tabla 1.3.- Pautas de fármacos recomendados para tratamiento inicial de tuberculosis en situaciones clínicas distintas.....	1.27
Tabla 3.1.- Datos de población/ año que asiste el HUDr. Peset durante el estudio.....	3.1
Tabla 3.2.- Procedimiento y valoración microscópica del esputo.....	3.12
Tabla 3.3.- Observación de BAAR al microscopio y criterio de interpretación.....	3.13
Tabla 3.4.- Método de descontaminación mediante la técnica BD BBL MycoPrep®.....	3.14
Tabla 3.5.- Clasificación de Runyon. Micobacterias aisladas en muestras clínicas.....	3.17
Tabla 3.6.- Concentraciones inicial y ampliada de tuberculostáticos frente a <i>M. tuberculosis</i> en BACTEC MGIT 960®.....	3.34
Tabla 3.7.- Mutaciones en genes, <i>rpoB</i> , <i>katG</i> y/ o <i>inhA</i> y sus correspondientes “wild type” detectados mediante MTBDR <i>plus</i> ®.....	3.37
Tabla 3.8.- Mutaciones en genes <i>gyrA</i> , <i>rrs</i> y <i>embB</i> y sus correspondientes “wild type” detectados mediante MTBDRs/V.1.0®.....	3.41
Tabla 3.9.- Mutaciones en genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>rrs</i> y <i>eis</i> y sus correspondientes “wild type” detectados mediante MTBDRs/V.2.0®.....	3.43
Tabla 3.10.- Resistencias conocidas detectadas por <i>PhyResSE</i>	3.49

Tabla 4.1.- Distribución por años de aislamientos de MTB y casos de tuberculosis desde muestras remitidas al Servicio de Microbiología del HUDr. Peset.....	4.2
Tabla 4.2.- Lugar de origen de los pacientes extranjeros con TB (n= 175).....	4.9
Tabla 4.3.- Distribución de los casos de TB según localización pulmonar o extrapulmonar.....	4.12
Tabla 4.4.- Casos de pacientes con más de un episodio de TB con aislamiento de MTB.....	4.15
Tabla 4.5.- Rentabilidad de la baciloscopia en casos de TBP y TBEP.....	4.17
Tabla 4.6.- Rentabilidad de la baciloscopia según el tipo de muestra.....	4.18
Tabla 4. 7.- Días de crecimiento según tipo de muestra y tipo de medio de cultivo. (Intervalo de confianza al 95%).....	4.20
Tabla 4.8.- Tiempos de crecimiento de esputos según baciloscopia positiva o negativa y según el medio de cultivo.....	4.21
Tabla 4.9.- Descripción de resistencias detalladas a lo largo del estudio.....	4.25
Tabla 4.10.- Resistencias globales a un solo fármaco (n= 41) por sistema SIRE-P BACTEC MGIT 960 en los aislados de los 469 casos estudiados.....	4.26
Tabla 4.11.- Patrones de todas las cepas resistentes a rifampicina y/ o isoniacida confirmadas por métodos genotípicos convencionales (GenoType MTBDR <i>plus</i> ®).....	4.31
Tabla 4.12.- Patrones de todas las cepas resistentes a rifampicina y/ o isoniacida y etambutol confirmadas por métodos genotípicos convencionales (GenoType MTBDRs/ V.1.0).....	4.32
Tabla 4.13.- Características demográficas y microbiológicas de los pacientes MDR-TB.....	4.34

Tabla 4.14.- Evolución a lo largo de los años de todas las cepas del paciente MDR-TB y descripción de las resistencias fenotípicamente y por PCR hibridación reversa.....	4.35
Tabla 4.15.- SNPs de linajes y sublinajes encontrados.....	4.37
Tabla 4.16.- Resistencia a tuberculostáticos, SNPs, genes y cambios de nucleótidos.....	4.38
Tabla 4.17.- Comparación de las resistencias detectadas a los tuberculostáticos de las cepas MDR-TB mediante los tres métodos de detección utilizados.....	4.39
Tabla 4.18.- Mutaciones detectadas mediante secuenciación MiSeq de Illumina® y su comparación con método fenotípico y PCR- hibridación reversa (HAIN) mediante los ensayos (MTBDR <i>plus</i> INH/ RIFA), MTBDR <i>s</i> / V.1.0 (EMB, FQ, AG- PC) y MTBDR <i>s</i> /V.2.0 (FQ y AG- PC).....	4.42
Tabla 4.19.- Resultado de GeneXpert sobre muestra inicial en casos de tuberculosis con aislamiento positivo según localización y baciloscopia.....	4.53
Tabla 4.20.- “Justificación” de petición de GeneXpert MTB/ RIF en casos con negatividad de cultivo y no confirmación microbiológica de TB.....	4.53
Tabla 4.21.- Valores de la capacidad predictiva de GeneXpert comparados con la baciloscopia (intervalo confianza 95%).....	4.55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1.- Sistemas automatizados BACTEC MGIT 960® (BD) y MB® (BioMérieux) para micobacterias.....	3.15
Figura 3.2.- Ejemplos de aspecto físico de crecimiento en LJ de distintas especies de micobacterias.....	3.16
Figura 3.3.- Metodología e interpretación de prueba IC para detección de Ag MPT64.....	3.19
Figura 3.4.- Captura de imagen de pantalla en ejemplos de gráfica de amplificaciones, valores e interpretaciones de PCR en tiempo real sistema GeneXpert MTB/ RIF Cepheid®).....	3.29
Figura 3.5.- Región determinante de resistencia a rifampicina. Parte del genoma de <i>M. tuberculosis</i> con indicación de principales mutaciones sensibles a rifampicina.....	3.38
Figura 3.6.- Regiones de resistencia a fluoroquinolonas del gen <i>gyrA</i> . Los números especifican las posiciones de los aminoácidos para todas la mutaciones listadas en la tabla.....	3.42
Figura 4.1.- Distribución en el Departamento de Salud Valencia- Dr. Peset de casos de MTB y de MNT (2005- 2015).....	4.1
Figura 4.2.1.- Número de tasa de incidencia y casos de TB confirmadas por años desde el Servicio de Microbiología en el Departamento de Salud Valencia Dr. Peset.....	4.3
Figura 4.2.2- Comparación de incidencia según origen de datos y zona estudiada en la Comunitat Valenciana según informes de Salud- TB.....	4.4
Figura 4.3.- Distribución temporal y por sexo de casos de TB.....	4.5
Figura 4.4.- Distribución de casos de TB por grupo de edad y sexo.....	4.6

Figura 4.5.- Casos de TB confirmada/ año según pacientes españoles/ extranjeros.....	4.7
Figura 4.6.- Evolución de la TB desde el año 1998 al 2015 de los casos nacionales y extranjeros. Datos obtenidos del Informe de Salud- TB de la Conselleria de Sanitat en la Comunitat Valenciana.....	4.8
Figura 4.7.- Distribución de TB en hombre/ mujeres respecto al global, en nacionalidad española y extranjera por sexo.....	4.8
Figura 4.8.- Evolución por años de casos con coinfección TB- VIH confirmados en el Departamento de Salud Valencia- Dr. Peset.....	4.10
Figura 4.9.- Pacientes con coinfección TB- VIH. Distribución por grupo de edad y sexo.....	4.11
Figura 4.10.- Distribución por años de las TB pulmonares (TBP) y extrapulmonares (TBEP).....	4.13
Figura 4.11.- Servicio de origen de los casos con diagnóstico de TB confirmada en el Servicio de Microbiología.....	4.14
Figura 4.12.- Resultados globales de baciloscopia en los casos de TB y su cuantificación en cruces de las baciloscopias positivas.....	4.16
Figura 4.13.- Ejemplos e interpretación de casos con distinto resultado en la baciloscopia semicuantitativa.....	4.16
Figura 4.14.- Evolución de los casos de baciloscopias positivas y su porcentaje por años desde al año 2005 al 2015.....	4.17
Figura 4.15.- Diferencias entre casos con baciloscopia positiva/ negativa y su localización.....	4.18
Figura 4.16.- Rentabilidad de la baciloscopia en pacientes con coinfección TB- VIH y pacientes con TB y VIH negativos.....	4.19
Figura 4.17.- Tiempos de crecimiento en medio de cultivo líquido de MGIT para muestras de esputo.....	4.21

Figura 4.18.- Tinción de Ziehl- Neelsen con “cord factor” positivo a partir de crecimientos en medio MGIT de cepas de MTB.....	4.22
Figura 4.19.- Identificación de <i>M. tuberculosis</i> complex mediante inmunocromatografía (TBc IC- BD®).....	4.22
Figura 4.20.- Ejemplos de perfiles para identificación de distintas especies dentro del complejo <i>M. tuberculosis</i> mediante GenoType MTBC- HAIN LifeScience®.....	4.23
Figura 4.21.- Distribución y tendencia por años de los casos de TB con resistencia a tuberculostáticos.....	4.24
Figura 4.22.- Resistencias globales (n= 90) a los tuberculostáticos en los 469 casos estudiados.....	4.26
Figura 4.23.- Distribución por años de los casos de MDR-TB a lo largo del estudio.....	4.27
Figura 4.24.- Distribución de casos con cepas sensibles o resistentes frente a tuberculostáticos de primera línea según variable demográfica analizada.....	4.28
Figura 4.25.- Patrones de bandas de cepas confirmadas con resistencia a rifampicina y/ o isoniacida mediante el GenoType MTBDR <i>plus</i> ®.....	4.29
Figura 4.26.- Patrón de bandas de cepas confirmadas con resistencia a etambutol mediante el GenoType MTBDRs/V.1.0.....	4.32
Figura 4.27.- Patrón de bandas de cepas confirmadas con resistencia a kanamicina mediante el GenoType MTBDRs/V.2.0.....	4.33
Figura 4.28.- Patrón de bandas de las resistencias detectadas por PCR- hibridación reversa del paciente MDR-TB a lo largo de los años.....	4.35
Figura 4.29.- Ejemplos de frecuencia de lectura tras secuenciación en MiSeq de Illumina.....	4.40
Figura 4.30.- Resultados de GeneXpert sobre muestra directa en 151 casos de tuberculosis confirmada.....	4.52

Figura 4.31.- Evolución de la demora de confirmación de MTB en muestra de caso de TB en el Departamento de Salud Valencia- Dr. Peset.....	4.57
Figura 4.32.- Demora diagnóstica en días en la identificación de MTB en los casos TB de los años 2010- 2015 en el Departamento de Salud HUDr. Peset.....	4.59
Figura 4.33.- Demora diagnóstica en el HUDr. Peset según datos de Conselleria Sanitat en comparación con la demora diagnóstica microbiológica en el HUDr. Peset.....	4.59
Figura 4.34.- Comparación demora diagnóstica y estancia media hospitalaria en pacientes con TB en el HUDr. Peset y en la Comunitat Valenciana según la Conselleria de Sanitat.....	4.60

1.- Introducción

1.1.- La tuberculosis en nuestro medio y su entorno. Situación actual.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa crónico- granulomatosa, causada por *Mycobacterium tuberculosis* complex. Pese a los avances realizados en el conocimiento de su etiopatogenia, diagnóstico, control, pautas terapéuticas y posibles vacunas, ésta continúa manteniéndose como un importante problema de salud pública a nivel mundial, por lo que se requiere un mayor compromiso por parte de las autoridades sanitarias a nivel nacional e internacional para mejorar los mecanismos de diagnóstico y control de la misma ^(1,2).

Así, aunque en las últimas décadas se han realizado importantes avances en su abordaje como problema grave de salud pública a nivel mundial, su riesgo de transmisión de persona a persona asociado a otros múltiples factores hace que se mantengan hasta el presente altas tasas de morbi- mortalidad ^(3,4). La TB sigue siendo una de las enfermedades transmisibles que causa más muertes en el mundo ⁽¹⁾ y que ha causado más muertes en los últimos 200 años que cualquier otra enfermedad infecciosa ⁽⁵⁾.

Su prevalencia e incidencia además se relaciona directamente con el nivel socio-económico de la población a la que afecta, por lo que su implicación como problema de salud pública se produce de forma prevalente a expensas de los casos en países en vías de desarrollo, habiendo disminuido progresivamente en los últimos tiempos en los países desarrollados ⁽⁶⁾. Así más del 95% de los casos de TB y muertes asociadas a la misma se describen en países con ingresos bajos y medios ⁽⁷⁾.

La situación actual de la TB se ha visto agravada desde hace años por el creciente número de casos/ brotes con resistencia a isoniacida y rifampicina (cepas MDR-TB), o más recientemente por casos de MDR-TB con resistencias además a fármacos de segunda línea de uso parenteral (amikacina, kanamicina o capreomicina) y a fluoroquinolonas (cepas XDR-TB) ^(8,9).

Aunque en realidad este tipo de resistencias en nuestro entorno parece no suponer un problema grave en la actualidad, la falta de datos oficiales nos obliga a intentar mejorar los mecanismos de detección y declaración de los mismos ⁽¹⁰⁾. El

diagnóstico precoz de la tuberculosis activa y la detección de estas cepas MDR-TB o XDR-TB son esenciales para interrumpir la transmisión ⁽¹¹⁾.

Los objetivos de la Organización Mundial de la OMS (OMS) para el año 2000 ya incluían la disminución progresiva de los casos de TB. Estos objetivos se han ido retrasando, primero hasta el 2015 y ahora para el 2050, replanteándose de nuevo la posibilidad de erradicación de la enfermedad a nivel mundial con pasos intermedios a objetivar en el 2030. Para ello, la OMS ha establecido programas de “Estrategias de Alto a la Tuberculosis” o de “Apoyo al Plan Mundial para Detener la Tuberculosis”, tratando de lograr como objetivo para el año 2050 que la TB deje de ser un problema de salud pública, lo que implicaría que se declararan menos de un caso por millón de personas/año ⁽¹⁾.

Así, las Naciones Unidas adoptaron en 2015 los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) para 2030; una de sus metas es poner fin a la epidemia mundial de tuberculosis. En la estrategia Fin a la Tuberculosis de la OMS, aprobada por la Asamblea Mundial de la Salud en 2014, se pide una reducción del 90% de las muertes por TB y una reducción del 80% en su tasa de incidencia para el año 2030 ⁽¹⁾.

Entre las estrategias recomendadas por la OMS para estos objetivos resulta de enorme interés práctico aquellas basadas en mejorar de forma determinante los métodos microbiológicos de diagnóstico del caso y de detección de brotes resistentes. Parece coherente y adecuado aplicar para ello métodos de diagnóstico etiológico rápido, especialmente en los pacientes bacilíferos, tratamientos efectivos tanto de la infección como de la enfermedad, así como establecer medidas de prevención y control adecuadas con apoyo institucional como base para su eficacia ⁽¹²⁾. Existen circunstancias actuales, como el incremento de la resistencia a fármacos, la coinfección por VIH y la movilidad geográfica relacionada con la inmigración que dificultan esta tarea⁽¹³⁾. Esto supone un mayor trabajo y una mayor dedicación de los organismos estatales e internacionales que deberán coordinar de forma adecuada el control de la tuberculosis a nivel mundial ⁽⁶⁾.

Una aproximación reciente a la realidad de la TB nos la da el informe de 2016 de la OMS, donde el número mundial estimado de casos nuevos (incidentes) de TB en

2015 fue de 10,4 millones, el 56% en hombres y el 34% en mujeres, con 1,0 millón de casos en niños y 1,8 millones de fallecimientos asociados. Las personas con coinfección por VIH representaron 1,2 millones (11%) de todos los casos nuevos de TB ⁽¹⁾.

En los últimos informes de la OMS se describe un descenso progresivo de la incidencia de TB en zonas industrializadas, manteniéndose sin embargo el problema en países de Asia (55% de casos) y África (31%) ⁽¹⁴⁾. En el último informe de la OMS se agrupan el 60% de los casos nuevos en seis países: India, Indonesia, China, Nigeria, Pakistán y Sudáfrica ⁽¹⁾. Estos informes destacan los problemas del elevado porcentaje de pacientes bacilíferos, los casos en pacientes VIH e inmigración, así como la necesidad de un mejor control de las cepas multirresistentes ⁽¹⁵⁾. La situación de la TB multirresistente a nivel mundial es preocupante y la respuesta global muy deficiente. Se estima que el 3,9% de los casos nuevos de TB en el mundo padecen MDR-TB, porcentaje que asciende al 21% en los enfermos previamente tratados ⁽¹⁶⁾. En 2015, a nivel mundial el número estimado de casos nuevos de tuberculosis multirresistente fue de 480.000 ⁽¹⁾. Solo el 26% de los estimados fueron notificados a nivel mundial, con una tasa de curación del 52%. O sea, que sólo se consiguió curar el 10% de los enfermos estimados de MDR-TB en el mundo, respuesta absolutamente ineficaz para controlar la epidemia ⁽¹⁶⁾.

Los casos de muerte por TB disminuyeron en un 22% entre 2000 y 2015, si bien la TB continuó siendo una de las diez principales causas mundiales de muerte en 2015⁽¹⁾ (número estimado 1,4 millones sumados a otros 0,4 millones en TB con coinfección por VIH). En pacientes VIH la TB es la causa de muerte más frecuente siendo el 26% de muertes relacionadas con el SIDA. La tasa de éxito del tratamiento para todos los nuevos pacientes sin VIH es del 87%, en contraste con una tasa de éxito de 73% para los pacientes con VIH. La forma más letal de tuberculosis fue la meningitis tuberculosa⁽⁷⁾.

En relación con las variables (VIH, inmigración, resistencia, etc....) los datos sobre TB a nivel mundial, Europa, España y Comunitat Valenciana se presentan de forma homogénea en distintos boletines que las diversas entidades responsables se encargan de elaborar. El reconocimiento por parte de la OMS de la TB como problema de salud pública que se mantiene a pesar de los esfuerzos realizados ha concienciado a los distintos profesionales implicados en el tema (clínicos, epidemiólogos,

microbiólogos, etc...) y a las autoridades sanitarias de cada zona a participar en la elaboración y cumplimiento de las pautas adecuadas para conseguir un descenso progresivo de casos, con el objetivo establecido ya para el 2050 de llegar a incidencias que no superan el 1/ 10⁵ habitantes a nivel mundial ^(1,14,17,18).

En nuestro país estos esfuerzos se han centralizado a nivel nacional en la “Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica” (RENAVE) encargada de recoger los datos de TB como enfermedad de declaración obligatoria (EDO), elaborando anualmente el Instituto Carlos III dentro del Boletín Epidemiológico Semanal del Centro Nacional de Epidemiología, los informes respecto a la situación de la TB en España. En estos informes se comentan los resultados anuales de casos declarados en España y sus comunidades autónomas, tasa de incidencia, características de los casos declarados, resultados de laboratorio y datos de resistencias ⁽¹⁹⁾.

1.1.1.- Situación de la TB en Europa.

En la mayoría de los países occidentales, incluyendo Europa, se ha producido desde el final del siglo XX un descenso progresivo en el número de casos de TB asociado a la introducción del tratamiento antirretroviral en los pacientes con coinfección por VIH, la aplicación de medidas de control y la mejora de las condiciones socio-económicas de la población afectada. Sin embargo, esta disminución se ha enlentecido en los últimos años por la llegada de un gran número de inmigrantes procedentes de regiones endémicas de TB ⁽⁴⁾.

La vigilancia de la tuberculosis en los países de la Unión Europea/ Área Económica Europea (UE/ AEE) corresponde al ECDC (Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades) en coordinación con la Oficina Regional Europea de la OMS que recoge los datos del resto de los países de la No UE/ AEE, formando los 53 países de la Región Europea de la OMS ⁽²⁰⁾.

Los datos más recientes con cifras oficiales de TB en Europa corresponden al Informe de Vigilancia y seguimiento de la Tuberculosis en Europa de 2017 con cifras

hasta el año 2015 ⁽²¹⁾. En 2015, se estimaron 323.000 casos nuevos de TB en la Región Europea de la OMS equivalente a una incidencia promedio de 35,5 casos por 100.000 habitantes (rango 32,9- 38,3). Ésta cifra representa alrededor del 3% de la carga total de TB en el mundo. Durante 2015 los casos de TB en la Región Europea de la OMS disminuyeron en 10.000 casos en comparación con el año anterior. Alrededor del 85% de los casos de TB en esta región se produjeron en los 18 países de alta prioridad (HPC) donde la incidencia estimada de TB fue de 68,0 casos por 100.000 habitantes, que es el doble del promedio para la Región Europea de la OMS y 5,4 veces más que el promedio de la UE/ AEE. Los datos concretos por años de la tasa de incidencia de la TB en Europa según la situación geográfica se observan en la tabla 1.1 ⁽²¹⁾.

Tabla 1.1.- Tasa de incidencia de casos de TB y cambio medio anual en porcentaje de las tasas en la Región Europea de la OMS entre los años 2011 y 2015 ⁽²¹⁾.

	2011	2012	2013	2014	2015	Cambio anual %
EU/ EEA	14,5	13,8	12,9	12,1	11,7	-5,3%
No EU/ EEA	79,8	75,6	75,5	68,3	63,9	-5,4%
Total Región Europea	42,8	40,9	40,4	36,7	34,5	-5,3%
Subtotal 18 HPC	84,7	80,4	79,4	72,5	68,0	-5,3%

UE/ AEE: Austria, Bélgica, Bulgaria, Croacia, Chipre, República Checa, Dinamarca, Estonia, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Islandia, Irlanda, Italia, Letonia, Liechtenstein, Lituania, Luxemburgo, Malta, Países Bajos, Noruega, Polonia, Portugal, Rumania, Eslovaquia, Eslovenia, España, Suecia y Reino Unido.

No UE/ AEE: Albania, Andorra, Armenia, Azerbaiyán, Bielorrusia, Bosnia y Herzegovina, República Yugoslava de Macedonia, Georgia, Israel, Kazajstán, Kirguistán, Moldavia, Mónaco, Montenegro, Rusia, San Marino, Serbia, Suiza, Tayikistán, Turquía, Turkmenistán, Ucrania y Uzbekistán.

HPC: Armenia, Azerbaiyán, Bielorrusia, Bulgaria, Estonia, Georgia, Kazajstán, Kirguistán, Letonia, Lituania, Moldavia, Rumania, Rusia, Tayikistán, Turquía, Turkmenistán, Ucrania y Uzbekistán.

Desde el año 2000, la incidencia de tuberculosis en la Región Europea ha ido disminuyendo, durante la última década la disminución promedio fue de 5,4% por año entre 2006 a 2015, y se redujo a 4,3% por año y continuó disminuyendo aún más en 2015 en un 3,3% en comparación con 2014. Sin embargo, a pesar de ser el descenso más rápido en el mundo en comparación con otras regiones de la OMS es necesaria una disminución más rápida para alcanzar los objetivos propuestos de La Estrategia Fin de la TB para el año 2035 ⁽²¹⁾.

En 2015, se estimaron 32.000 muertes por TB en la Región Europea de la OMS (3,5 muertes por 100.000 habitantes). Hubo una variación considerable en toda la Región, va desde menos de una muerte por 100.000 habitantes en los países de Europa Occidental a más de 10 casos por cada 100.000 habitantes en los 18 países de alta prioridad. A nivel regional la tasa de mortalidad por TB disminuyó en un 50%, desde 7,0 a 3,5 muertes por 100.000 habitantes entre 2006 y 2015, que en promedio es un descenso del 7,4% por año. Se detectaron 27.000 casos con coinfección TB- VIH (8,4%) siendo un 4,6% en el grupo de países UE/ AEE y 9,3 en los países de la No UE/ AEE⁽²¹⁾.

Uno de cada cinco casos de tuberculosis multirresistente a nivel mundial se estima que ocurrió en la Región Europea en 2015. Las tasas alarmantemente altas de MDR-TB en la mayoría de los países de Europa oriental y los países de Asia central representa uno de los principales desafíos del control de la TB en la Región Europea de la OMS, nueve de cada diez países con mayor carga de MDR-TB en el mundo está en esta Región. En 2015 se estima que alrededor de 120.000 personas tenían TB con resistencia a rifampicina y multirresistencia en la Región Europea de la OMS, donde un 16% de los casos nuevos y un 48% de los casos tratados anteriormente tenían MDR-TB. A pesar del gran descenso en los casos de TB por cápita, la tasa de notificación de multirresistencia aumentó de 3,0 a 3,9 por 100.000 debido a que en los últimos años se están notificando más casos de MDR-TB y XDR-TB⁽²¹⁾.

1.1.2.- Situación de la TB en España y en la Comunidad Valenciana.

1.1.2.1.- Datos de TB en España.

En España la TB es objeto de vigilancia epidemiológica desde principios del siglo XX y forma parte de las enfermedades de declaración obligatoria (EDO). A partir de 1979 las EDO fueron asumidas por las Comunidades Autónomas (CCAA), desarrollando algunas de ellas Programas de Prevención y Control de la TB. La vigilancia y control de esta enfermedad ha tenido un desarrollo desigual en las diferentes CCAA⁽²²⁾.

Hasta el año 1995 sólo era obligatoria la declaración numérica de casos clínicos de posible TB pulmonar en el ámbito estatal, por lo que no era posible distinguir entre casos sospechosos o confirmados, ni desglosar los datos por variables epidemiológicas básicas tales como edad o sexo. En 1996, el 82% de las Comunidades y Ceuta admitían tener algún programa de control mientras que las restantes más Melilla, carecían de él⁽²²⁾. Tras la creación de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) en 1995, se añadió la meningitis tuberculosa y se estableció la declaración individualizada de los casos. Así, en el año 2004 se amplió la definición de caso para incluir todas las formas de tuberculosis, siguiendo las recomendaciones europeas. A partir de entonces se dispone de información en España sobre los casos de tuberculosis de todas las localizaciones en tres categorías de declaración: tuberculosis respiratoria, meningitis tuberculosa y otras tuberculosis. Tras la puesta en marcha de estos programas de control de la tuberculosis para mejorar la coordinación entre autonomías se ha conseguido una disminución de tasas, aunque todavía quedaría mucha tarea por hacer⁽²³⁾. En el informe del ECDC del 2014 España está considerada como país de baja incidencia, donde se incluyen aquellos países con tasas inferiores a 20 casos/ 10⁵ habitantes ⁽²⁰⁾.

Existe en España una información no siempre válida sobre TB e inmigración que no alcanza además a todas las CCAA y aunque faltan datos sobre la importancia de la inmigración y sus características diferenciales. Si se detecta una asociación entre inmigración y cambios en la epidemiología de la TB ⁽²²⁾. La llegada masiva de inmigrantes a partir del año 2000 en diversas partes de España supuso un incremento progresivo en el número de casos notificados en extranjeros, en paralelo a una mejora de las fuentes de información, con una repercusión significativa en la epidemiología de la enfermedad. El incremento de la inmigración ha modificado sustancialmente las características de los enfermos de TB, por lo menos en algunas zonas de España ^(4,22).

Es a partir del año 2008 cuando se observa un descenso de la TB, tanto en casos españoles como extranjeros, si bien en estos últimos no es tan acusado. En el año 2013, el 32% de los casos notificados lo fueron en personas nacidas en el extranjero, con grandes variaciones entre comunidades autónomas, que van desde menos del 8% en Asturias, Galicia o Extremadura hasta más del 40% en La Rioja, Cataluña, Murcia o Madrid. El origen de los casos es muy diverso y está en relación con la procedencia de

la población inmigrante asentada en cada zona. A nivel general, en España el país de procedencia con mayor número de casos en 2013 fue Marruecos (23%), seguido de Pakistán (11%), Rumanía (10%) y Bolivia (7%) ⁽⁴⁾.

Según el informe conjunto ECDC/ OMS del año 2012, España se encuentra en noveno lugar dentro de los países de la UE/ AEE en cuanto a tasas de notificación. En 2012 la tasa de TB en España fue de 13 casos/ 10⁵ habitantes, muy similar a la tasa media de la UE (13,8 casos/ 10⁵ habitantes), aunque inferior a la de Rumania (85), Lituania (59), Letonia (48), Bulgaria (31), Portugal (25), pero superior a la de Irlanda (8), Dinamarca (7), Holanda (5,7) y Alemania (5,2) ⁽²⁴⁾.

En los datos publicados en el informe conjunto ECDC/ OMS correspondientes al año 2013, la tasa de notificación en España fue ligeramente inferior a la media de la UE (tasa media de la UE 12,9), presentando valores similares a las de Hungría (10,6), Malta (11,9), Croacia (12,3) y Reino Unido (12,4). El país de la UE/ AEE con la tasa más elevada fue Rumanía, con 83,5 casos/ 10⁵, seguido de Letonia (44,7). Los países con tasas más bajas de esta área fueron Islandia y Holanda con 3,4 y 5,1 casos/ 10⁵ habitantes respectivamente ⁽²⁰⁾.

En datos más actuales, en el año 2013 se notificaron 5.535 casos de tuberculosis (incidencia de 11,88 casos por 10⁵ habitantes) 4.166 de tuberculosis respiratoria, 73 a meningitis tuberculosa, y 1.296 a tuberculosis de otras localizaciones (tasas de 8,94; 0,16 y 2,78 casos por 10⁵ habitantes, respectivamente). Este año, atendiendo a las CCAA con mayor tasa son Melilla con 27,63, seguido de Ceuta (22,44), Galicia (21,75), Cataluña (15,54) y La Rioja (15,58) ⁽²⁴⁾. En 2014 se mantiene el descenso de casos se notificaron 5.018 (10,80 casos por 10⁵ habitantes) manteniéndose las 4 CCAA con mayores tasas ⁽²⁰⁾.

Los informes más recientes con cifras oficiales de TB en España son del Informe Epidemiológico sobre la situación de la Tuberculosis en España de 2015 donde se confirma que la tasa de incidencia sigue con su tendencia descendente, siendo este porcentaje de disminución de mayor magnitud en 2014 que en 2013 (10% en 2014 frente a 8% en 2013). Este descenso se observa en todas las localizaciones. No obstante, la OMS ha estimado, para los países de baja incidencia, que sería necesario una

disminución anual del 11% para llegar a la eliminación en 2050. Dado que España no se considera un país de baja incidencia según la OMS (países con tasas inferiores a 10 casos por 100.000 habitantes) los datos apuntan a que se necesitan esfuerzos adicionales para alcanzar este objetivo. El análisis de los datos de la RENAVE permite afirmar que la incidencia de la tuberculosis en España está disminuyendo, pero a un ritmo inferior al deseable para llegar a los objetivos de la eliminación de tuberculosis ⁽²⁰⁾. Así pues, parece que la realidad en nuestro país nos muestra que, a pesar de la mejora progresiva en nuestra situación en relación a la TB, el conocimiento de su epidemiología no es todavía el óptimo, especialmente en relación con importantes factores como coinfección por VIH y casos de resistencia ⁽²³⁾.

En España la situación de la multiresistencia en TB es difícil de precisar, asociado a la no realización sistemática de antibiograma. Aun así, se comenta una situación favorable respecto a otras áreas a nivel mundial ⁽¹⁶⁾. En este país se plantea el problema de que sólo se conocen datos parciales, tomados de fuentes distintas y publicadas en series no controladas ⁽²³⁾. De los últimos datos al respecto se objetivan porcentajes de MDR-TB primaria del 0,1% en autóctonos y del 2,2% en inmigrantes y resistencia primaria a isoniacida del 3,4% y 10,2% respectivamente ⁽¹⁶⁾.

En datos notificados ya en el 2006 se describen un 3,8% de casos de resistencia, con una tasa de resistencia primaria del 8,3% (4,9% a H) y de MDR-TB del 1,3%. El 33,6% de estos casos con resistencia correspondieron a personas extranjeras ⁽²⁵⁾. Dado que la inmigración y cepas resistentes asociadas no es un fenómeno homogéneo en todo el territorio español se deben realizar estudios locales o de áreas concretas para su vigilancia. Así, existen regiones como en El Ejido (Almería) donde se describe más del 70% de resistencias en el año 2001, mientras que en otros lugares como en la comarca del Bajo Deba (Guipúzcoa) entre 1995- 2006 este problema sólo supuso un 1,5%, similar a otras zonas en Valencia con sólo un 2,6% de resistencias en el periodo 1999- 2004 ⁽²³⁾.

Datos más recientes sobre resistencia a los tuberculostáticos en España muestran que en el año 2012 había un 4,25% de cepas MDR-TB (37 cepas), de estas una era XDR-TB (2,7%). El número de cepas resistentes a isoniacida, pero no a rifampicina es de 5,74% y el número de cepas resistentes a rifampicina, pero no a

isoniacida es mucho menor del 0,11% ⁽²⁶⁾. Los datos del año 2013 hasta junio de 2014 son de un 2,18% de casos MDR-TB (34 cepas), de las que dos eran XDR-TB (5,8%). El número de cepas resistentes a isoniacida, pero no a rifampicina fue de 5,51% y las cepas resistentes a rifampicina, pero no a isoniacida de 0,51% ⁽²⁵⁾. Los últimos datos publicados son hasta junio de 2015 donde hay un 2,16% de cepas MDR-TB (35 cepas), de estas 2 son XDR-TB (5,7%), siendo el número de cepas resistentes a isoniacida, pero no a rifampicina de 4,99% y de cepas resistentes a rifampicina, pero no a isoniacida de 0,25% ⁽²⁰⁾.

Los resultados de tratamiento han mejorado (83% de resultados satisfactorios), aunque siguen sin alcanzar el objetivo internacional del 85%. Es necesario mejorar el diagnóstico precoz en inmigrantes y adultos jóvenes, incidir en el estudio de contactos familiares, especialmente en niños, y hacer el seguimiento completo del tratamiento ⁽²⁰⁾.

1.1.2.2.- Datos de TB en la Comunitat Valenciana.

Los datos de la Comunitat Valenciana respecto a casos TB muestran, de forma similar al resto del país, un descenso mantenido en las tasas de incidencia. Desde finales de la década de los años 90 las tasas de TB en nuestra comunidad mantienen una tendencia descendente; de los 24 casos por 10⁵ habitantes del año 1998 a la tasa registrada en 2015 de 8,4 por 10⁵ habitantes, se ha producido una disminución del 65% lo que representa un descenso medio anual del 3,8% ⁽¹⁷⁾. Este descenso de las tasas en nuestro medio ha afectado a ambos sexos y a casi todos los grupos de edad, aunque se observan diferencias en los distintos grupos de edad. Es la Conselleria de Sanitat la que se encarga de coordinar a todos los profesionales implicados en el control de esta enfermedad y la que organiza los protocolos y pautas de actuación, ofreciendo a través de los informes anuales de Salud de Tuberculosis, los datos concretos por Departamentos de Salud ⁽¹⁷⁾.

Los datos de estos Informes de Salud nos muestran como la tuberculosis infantil, tras el importante incremento registrado en los años 2008 y 2013, mantiene la tendencia y disminuye en los últimos años especialmente la de los menores de 5 años y

fundamentalmente la de los niños (varones). También baja la de los mayores de 74 años, y en especial la de las mujeres. Por el contrario, se incrementa la tasa en la población de 25 a 34 años, aumento que afecta tanto a los hombres como a las mujeres⁽¹⁷⁾.

En el caso de TB en inmigración, los países que aportan mayor número de casos de TB asociada son: Rumania, Marruecos, Bolivia y Pakistán, que en conjunto suman el 60% de los casos extranjeros. La localización pulmonar denominada tuberculosis pulmonar (TBP) es la forma de presentación más frecuente, habiendo disminuido ligeramente su tasa en los últimos informes a expensas de los casos con tuberculosis extrapulmonar (TBEP) ⁽¹⁷⁾.

Un análisis más concreto de los últimos informes sobre tuberculosis publicados por la Conselleria de Sanitat de la Generalitat Valenciana (Tabla 1.2) muestra que la disminución de la tasa de TB ocurre en las tres provincias (Castellón, Valencia y Alicante).

Tabla 1.2.- Casos de TB en la Comunitat Valenciana. Periodo 2011- 2015 ⁽¹⁷⁾.

Año	Casos Autóctonos	Casos Importados	Casos ExtraC.	Casos Totales	Tasa por provincias 10 ⁵		
					VLN	CS	ALC
2010	664	28	15	707	15,0	12,8	10,9
2011	607	27	14	648	12,8	20,3	11,3
2012	508	20	13	541	11,2	9,6	8,4
2013	512	17	0	529	11,7	8,9	8,0
2014	424	27	4	455	9,4	9,1	6,5
2015	421	34	0	455	9,0	8,4	7,6

ExtraC: Extracomunitarios, VLN: Valencia, CS: Castellón, ALC: Alicante

Así pues, a nivel de Comunitat Valenciana, a través de la declaración de TB como EDO en la Conselleria de Sanitat y de la puesta en marcha de la RedMiva, en la que los Servicios de Microbiología de los Hospitales vuelcan su información al Centro Superior de Investigación de Salud Pública, es este organismo el encargado de coordinar y pautar las actuaciones pertinentes encaminadas al objetivo de controlar y disminuir las tasas de TB en los distintos Departamentos de Salud de esta comunidad.

Los datos recogidos y elaborados se muestran en los Informes de Salud- TB que se publican cada año. Estos son la base para dar a conocer a todos los implicados en el tema la evolución del tema en nuestro entorno, confirmando el descenso progresivo de incidencia y valorando datos por áreas de rentabilidad diagnóstica, baciloscopia, demora de declaración, papel de coinfección por VIH, TB en población extranjera, resistencias informadas y otras variables sobre las que cada Departamento de Salud puede y debe “replantearse” su actuación en el tema ^(17,27,31).

1.2.- Tuberculosis: factores de riesgo y formas de prevención.

1.2.1.- Aspectos patogénicos.

La TB es una enfermedad vinculada clásicamente a situaciones de pobreza y déficits en sistema socio- sanitario. El reservorio fundamental de *M. tuberculosis* es el hombre (infectado o enfermo), mientras que en *M. bovis* suele ser el ganado bovino, siendo esta última resistente a la pirazinamida, que además de las implicaciones de tratamiento que conlleva, permite orientar la identificación de la especie ⁽³²⁾. En nuestro ambiente, a excepción de los casos de punción accidental manipulando micobacterias, la transmisión de la TB es habitualmente mediante inhalación por vía aérea, a partir de contacto más o menos prolongado e intenso con un paciente bacilífero ⁽³³⁾.

La persona enferma con TB pulmonar activa elimina, microgotas infecciosas en forma de aerosoles, cargadas de micobacterias. Estas partículas infecciosas suspendidas en el aire con tamaño de 1- 5 μm si son inhaladas por una persona no infectada llegan al espacio alveolar produciendo el contagio. Se considera que debe llegar a un mínimo de 10 a 200 microgotas para que tenga lugar la infección ⁽³⁴⁾.

La mayoría de los individuos infectados por *M. tuberculosis* (90%) no desarrollan la enfermedad. Así, tras la inhalación de *M. tuberculosis* un individuo puede: i) no registrar una infección; ii) infectarse, pero luego borrar la infección con éxito; iii) contener la infección con presencia de bacilos, pero ausencia de síntomas (infección latente de

tuberculosis); o iv) desarrollar enfermedad progresiva. Se ha estimado que un tercio de la población mundial tiene infección TB latente y puede estar en riesgo de desarrollar enfermedad de TB asociada a mayor edad o situaciones de inmunodepresión en el futuro ⁽⁷⁾.

Tras el contagio es la inmunidad celular la que se encarga de limitar la infección. Por ello, la probabilidad de enfermar dependerá, en gran medida, de factores o condiciones del huésped que conlleven una cierta inmunodeficiencia ⁽³⁵⁾. En la transmisión pueden influir otros factores como son la capacidad “contagante” del enfermo con TB (la carga bacilar del caso fuente, las características de la tos, la cantidad de bacilos en el esputo, la cavitación en la radiografía de tórax, etc...), la duración de la exposición y la intensidad de la misma ⁽³⁶⁾. En general, el riesgo de infección entre los contactos domiciliarios de los pacientes con tuberculosis es un 30% ⁽⁷⁾.

Un mayor riesgo de desarrollar enfermedad tuberculosa tras la infección por *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTB) se produce en: i) *individuos con infección reciente*: inmigrantes recientes de países con tasas altas de TB, contactos íntimos de pacientes bacilíferos, niños hasta 5 años de edad y conversores de la prueba de tuberculina en los 2 años previos; y ii) *pacientes con factores de riesgo* que presentan condiciones clínicas que aumentan la posibilidad de progresión a enfermedad TB: infectados por VIH y/ o usuarios de drogas por vía parental ⁽³⁷⁾.

1.2.2.- Factores asociados.

Cuando se habla de factores de riesgo asociados a TB se incluye siempre el fenómeno de la inmigración y la situación de inmunodeficiencia celular por infección por VIH. La epidemiología de la TB, en Europa en general y en nuestro medio en particular, ha sido cambiante en base al fenómeno de la inmigración. En 2006 los casos de tuberculosis en inmigrantes suponían una media del 20% de los casos en nuestro entorno llegando incluso a superar el 40%. El aumento de la inmigración se ha asociado a un incremento no solo del número total de casos de TB sino también a cambios en el patrón de resistencias, con aumento de las mismas ⁽²³⁾.

La TB sigue siendo la infección oportunista más común en los pacientes infectados por VIH y una de las principales causas de muerte en estos casos, siendo por tanto un factor de riesgo asociado, especialmente en las zonas con mayor prevalencia de TB. La TB por *M. bovis* spp. *bovis* representa un riesgo adicional en los infectados por el VIH ⁽³⁸⁾.

Datos de distintos estudios en África subsahariana han demostrado que la TB está presente en aproximadamente la mitad de personas infectadas por VIH, con diagnóstico habitual en necropsia. En nuestro entorno las personas con infección por VIH tienen un mayor riesgo de tuberculosis activa debido a la reactivación de la TB latente y/ o una progresión más rápida de la enfermedad después de la infección tuberculosa, incluyendo infecciones oportunistas ⁽¹³⁾.

1.2.3.- Formas de presentación.

De las posibles formas clínicas de presentación, la más frecuente en todos los casos es la TB pulmonar (TBP), donde el paciente puede presentar síntomas respiratorios de varias semanas de duración con tos no remitente, dolor torácico y expectoración, así como sintomatología general (sudoración, fiebre, astenia, anorexia y pérdida de peso) ⁽⁷⁾. Debido a que en muchas ocasiones su sintomatología no es específica, es necesario un alto índice de sospecha clínica en pacientes con sintomatología sugerente para poder disminuir así la demora diagnóstica e inicio del tratamiento ^(6,39).

Las formas de presentación de casos de TB extrapulmonar van en aumento en los últimos años, pasando del 14% en los años 2005- 2007 al 20% en 2010- 2013. Teniendo en cuenta la dificultad diagnóstica de estas formas es probable que la proporción real de TBEP sea mucho mayor que la notificada constituyendo aproximadamente el 15- 20% de todos los casos de TB ^(40,41). Debido a las dificultades para la confirmación de las TB extrapulmonar el diagnóstico requiere una elevada sospecha clínica y la utilización de pautas de diagnóstico distintas. Ello conduce a retrasos diagnósticos, diagnósticos erróneos y aumento de morbi- mortalidad en estos

pacientes ^(14,40). Además, el 6% y el 20% de casos TBEP presentan TBP activa como foco primario. Así, siempre que se realiza un diagnóstico de TBEP, se debe investigar un posible foco pulmonar ya que esta última implica contagiosidad ⁽⁴²⁾.

Las formas de TBEP son múltiples, según el mecanismo patogénico de adquisición. Pueden presentarse de forma aislada, como foco secundario de TBP o como TBEP relacionada a una TBP, como ocurre en las TB de localización torácica: TB pleural, TB con afectación de ganglios hiliares y mediastínicos y/ o linfadenitis cervical o la TB con afectación de pericardio ⁽³⁹⁾.

Aunque *M. tuberculosis* es una bacteria localizada habitualmente en pulmón, puede implantarse por vía hematogena en cualquier otra localización dando diferentes formas clínicas que incluyen la forma de TB diseminada ⁽⁴³⁾. Estas formas extrapulmonares y diseminadas son más frecuentes en pacientes coinfectados por el VIH o en inmunodeprimidos ⁽⁴⁴⁾. La TBEP constituye más del 50% de todos los casos de tuberculosis en pacientes VIH positivos ⁽⁴⁰⁾. Se han asociado también a personas de razas no caucásica con origen asiático y africano, con edades jóvenes o incluso se ha descrito que las mujeres tienen mayor predisposición a presentarlas ^(41,45).

La TBEP no torácicas se clasifican, siguiendo las guías publicadas ^(6,34) como: i) *tuberculosis pleural*: afecta exclusivamente a la pleura, con o sin derrame; ii) *tuberculosis linfática*: afecta al sistema linfático (se distinguen las formas intratorácica y extratorácica según la localización de los ganglios afectados); iii) *tuberculosis ósteoarticular*: afecta a huesos y articulaciones (se distingue entre localización vertebral y no vertebral, normalmente consecuencia de diseminación hematogena bacilar donde la localización vertebral suele ser la más frecuente); iv) *tuberculosis genitourinaria*: afecta al aparato genital y/ o urinario (la urinaria producida por diseminación hematogena, la genital femenina con afectación principalmente en las trompas de Falopio bilateral y también con afectación de endometrio, mientras que en hombres pueden afectar al epidídimo, la próstata y con menor frecuencia a las vesículas seminales y los testículos); v) *tuberculosis del Sistema Nervioso Central*: afecta al SNC como consecuencia de la diseminación hematogena desde un foco distante o en escasas ocasiones como consecuencia de invasión por contigüidad; vi) *tuberculosis digestiva/ peritoneal*: afecta al peritoneo (con o sin ascitis) y al aparato digestivo, siendo

la localización ileocecal la más frecuente; vii) *tuberculosis diseminada*: afecta a más de dos aparatos o *tuberculosis miliar* (pulmonar y diseminada). El aislamiento de *M. tuberculosis* complex en sangre se considera como tuberculosis diseminada ^(6,34,46).

1.3.- *Mycobacterium tuberculosis* complex como agente etiológico de la TB.

1.3.1.- Aspectos microbiológicos y diferenciación de especie.

Las micobacterias son un amplio grupo de microorganismos que incluye las especies del género *Mycobacterium* (Orden *Actinomycetales*, Familia *Mycobacteriaceae*). Presentan un elevado contenido de guanina y citosina (61- 71% respectivamente) en su ADN. Son microorganismos aerobios estrictos, inmóviles, de morfología variable (bacilar o cocoide), que no forman esporas y no poseen flagelos ni cápsula. Poseen una pared celular gruesa y con un elevado contenido lipídico que supone el 60% del peso seco de la misma ⁽²⁾.

Para su clasificación y diferenciación microbiológica se utilizó ya inicialmente el estudio de las características físicas de las colonias crecidas en medio sólido de Löwenstein- Jensen (LJ): velocidad de crecimiento, morfología y producción de pigmento. Surgieron así los 4 grupos clásicos de Runyon que incluyen las especies no tuberculosas de posible interés clínico (Runyon, 1959) ⁽⁴⁷⁾. *Grupo I* (fotocromógenas), *Grupo II* (escotocromógenas) y *Grupo III* (no cromógenas) todas ellas de crecimiento lento (mayor a 14 días) y el *Grupo IV* o micobacterias de crecimiento rápido, generalmente menor a 7 días en LJ. Sin embargo, en esta clasificación no se incluye *M. tuberculosis* complex ni *M. leprae*, las dos especies patógenas ⁽²⁾.

Con fines prácticos y desde el punto de vista patogénico las micobacterias se clasifican en tres grupos en función de la entidad nosológica producida: i) *Mycobacterium tuberculosis* complex o bacilo de Koch que produce la tuberculosis; el complejo se encuentra formado por las especies: *M. tuberculosis*/ "*M. canetti*"; *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. bovis* subespecie BCG (bacilo de Calmette- Guerin utilizado en la vacunación), incluyéndose actualmente además *M. caprae* ⁽⁴⁸⁾, *M.*

pinnipedii ⁽⁴⁹⁾, *M. mungii* ⁽⁵⁰⁾, *M. orygis* ⁽⁵¹⁾; ii) Lepra por *Mycobacterium leprae* o bacilo de Hansen; y iii) micobacteriosis o patología por micobacterias no tuberculosas (MNT) ni lepra que se agrupan como MNT, también denominadas “micobacterias atípicas” ^(2,34). Estas MNT poseen un menor poder patogénico, que varía según especie, actuando generalmente como oportunistas, ampliamente distribuidas en la naturaleza con reservorio animal, ambiental o desconocido, o incluso pueden llegar a colonizar materiales médico- quirúrgicos y presentar en general resistencia a antituberculostáticos de primera línea ⁽⁵²⁾. La implicación de estas MNT como agente causal de cuadros pulmonares y/ o extrapulmonares obliga a descartar su presencia ante sospecha de TB, en especial ante baciloscopias positivas en cuadros pulmonares ⁽⁵³⁾.

Mycobacterium tuberculosis complex (MTB), agente causal de los cuadros de TB pulmonar y/ o extrapulmonar, incluye especies con las características generales del género: bacilos inmóviles, aerobios, resistentes a decoloración con ácido alcohol (BAAR), con tamaño de 0,2- 4 μm , sensibles a la luz solar, ultravioleta y calor, pero resistentes a la desecación. Su temperatura óptima de crecimiento es de 35- 37°C, a diferencia de otras especies que precisan temperaturas más bajas (30°C) como ocurre en especial en las aisladas en piel y tejidos blandos (*M. marinum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. ulcerans*, etc...) o de otras, en cambio, que requieren temperaturas más elevadas (42°C en casos de *M. xenopi* o incluso 52°C en *M. thermoresistibile*). *M. tuberculosis* produce en medio sólido de LJ colonias de aspecto rugoso no pigmentadas y de crecimiento lento con aspecto de migas de pan o coliflor, que se pueden confundir con algunas especies del Grupo III de Runyon. Aunque su aspecto físico puede ayudar a su diferenciación, en general resulta necesaria la utilización de características bioquímicas o técnicas moleculares para el diagnóstico específico de especie ⁽²⁾.

En la pared celular de MTB con su característico elevado contenido lipídico se diferencian varias capas: i) capa interna de peptidoglicano, que le proporciona rigidez y forma a la bacteria; ii) capa con arabinogalactanos que se encuentran unidos a los ácidos micólicos de la tercera capa, que son ácidos grasos de cadena larga (60- 90 átomos de carbono); y iii) la capa más externa constituida por lípidos como el “cord factor” (trehalosa 6, 6'- dimicolato). En conjunto, esta composición de la pared le confiere una escasa permeabilidad celular, responsable de la ineficacia de múltiples agentes antimicrobianos y de la característica ácido- alcohol resistencia (BAAR) que aparece

con determinadas tinciones para la visualización microscópica de los bacilos. Además, determinados componentes de la pared intervienen en la patogenia y favorecen la supervivencia del microorganismo en el interior de los macrófagos ⁽²⁾.

Sin embargo, todo BAAR no se corresponderá lógicamente siempre con MTB. La diferenciación e identificación del agente causal como perteneciente al complejo *M. tuberculosis* es esencial para establecer el diagnóstico de confirmación de una TB. Aunque en la actualidad la mayoría de los laboratorios realizan una identificación solo a nivel del complejo, en determinados casos, ante la sospecha clínica y/ o microbiológica de *M. bovis* u otra cepa del complejo se realiza una identificación específica habitualmente mediante técnicas de PCR- hibridación ^(54,55).

1.4.- El diagnóstico microbiológico de confirmación de TB. Pautas a aplicar desde el Servicio de Microbiología.

Uno de los mayores obstáculos para el control eficaz de la TB a nivel mundial es el retraso en su diagnóstico y detección de resistencia, donde habitualmente la demora se valora en semanas- meses. La OMS programó por ello un plan global para reducir a la mitad la prevalencia de tuberculosis y la mortalidad para el año 2015 y eliminar la enfermedad como problema de salud pública en 2050, lo que supone plantearse objetivos intermedios en nuestro medio para poder ir alcanzándolos progresivamente⁽⁵⁶⁾.

El diagnóstico clínico de la TB, basado en síntomas y signos característicos, pero muchas veces inespecíficos, es la base inicial para detectar y declarar el “caso de TB” tras sospecha. Sin embargo, el diagnóstico diferencial a veces resulta difícil. Por ello y por las implicaciones epidemiológicas y de salud pública del diagnóstico y declaración de una TB, resulta necesario aplicar los medios precisos para obtener el “caso de TB confirmado” microbiológicamente, que es el que establece un diagnóstico de certeza.

El laboratorio de micobacterias, dentro del Servicio de Microbiología, desempeña un papel fundamental en el control de la tuberculosis mediante la detección e identificación rápida del microorganismo. Resulta necesario en la actualidad aplicar

técnicas precisas y rápidas para el diagnóstico precoz de la tuberculosis activa para poder así plantear un tratamiento y control eficaz de cada caso ^(57,58).

Aunque los procedimientos convencionales han sido herramientas validas de diagnóstico, la baja sensibilidad de la detección de BAAR por microscopía, el lento crecimiento de MTB en los medios de cultivo y el tiempo necesario en la identificación bioquímica de especie, limitan la utilidad de estos métodos para un diagnóstico rápido y precoz, algo que debe ser objetivo principalmente en caso de TB. Algunas de las variables a tener presentes en la actualidad son: i) la coinfección por VIH, que al cambiar la presentación clínica de los casos conlleva reducción de la sensibilidad de los métodos clásicos; ii) el incremento de formas extrapulmonares, con baciloscopia frecuentemente negativa; y iii) la aparición y la propagación de cepas de MTB con resistencia a tuberculostáticos, que representan una grave amenaza para el control de la TB en todo el mundo. El diagnóstico precoz de la tuberculosis activa y la detección de estas cepas resistentes a múltiples fármacos (MDR-TB o XDR-TB) son esenciales para interrumpir la transmisión ⁽¹¹⁾.

El diagnóstico microbiológico de TB se ha basado tradicionalmente en la realización inicial de una baciloscopia, el aislamiento en cultivo de la cepa y en la identificación fenotípica del crecimiento. Aunque el método más rápido, fácil y barato disponible sigue siendo la tinción ácido alcohol resistente (detección de BAAR), su baja sensibilidad (45%- 80% sobre muestras con posterior cultivo positivo) ^(11,56) limita su utilidad, sobre todo en áreas de menor incidencia, en formas extrapulmonares y en pacientes infectados por VIH, donde la sensibilidad de la tinción es, si cabe, inferior. Por ello, la técnica de aislamiento de la cepa en cultivo sigue siendo considerada como el método de referencia, debido a su mayor sensibilidad ⁽¹¹⁾. Sin embargo, el problema de demora diagnóstica por el lento crecimiento de *M. tuberculosis* es un importante obstáculo para el diagnóstico rápido de la enfermedad. En la actualidad el objetivo principal es la búsqueda y aplicación de métodos microbiológicos para disminuir el tiempo de diagnóstico, aplicando técnicas de cultivo líquido automatizado, medios que consiguen crecimiento más rápido y métodos moleculares que detectan e identifican MTB no ya de colonia o masa con crecimiento sino incluso a partir de muestra clínica directa ^(56,59).

1.4.1.- Utilidad de la baciloscopia. Un método que se mantiene.

A pesar de los importantes avances tecnológicos experimentados en los últimos años en los laboratorios de micobacterias de los Servicios de Microbiología, el diagnóstico precoz de infección tuberculosa sigue recayendo en el examen microscópico de las muestras clínicas para detección de casos bacilíferos. La baciloscopia sigue siendo en la actualidad el procedimiento más simple, barato y rápido en proporcionar al clínico una orientación diagnóstica preliminar ⁽⁶⁰⁾.

La realización de esta tinción debe aplicarse de forma sistemática sobre cualquier muestra clínica, especialmente si es de origen pulmonar, ante sospecha de TB. Sin embargo, y a pesar de que tradicionalmente la presencia de BAAR en la muestra ha sido el método inicial ideal por su rapidez, simplicidad y bajo coste, su baja sensibilidad (45- 80% de cultivo positivo) y limitada especificidad, obligan a realizar siempre el cultivo y/ o métodos moleculares para su diagnóstico ^(11,56).

Los métodos utilizados en rutina para detección de BAAR son: i) tinciones basadas en la utilización de fucsina fenicada como colorante primario: Tinción Ziehl-Neelsen (ZN) donde los microorganismos se tiñen de rojo sobre un fondo azul; y ii) métodos que utilizan como colorante primario fluorocromos (Tinción auramina-rodamina) donde los microorganismos que son BAAR, bajo la luz ultravioleta, aparecen fluorescentes de color amarillo o naranja dependiendo del filtro empleado. La diferencia entre ambos métodos se basa en el aumento microscópico requerido y por tanto el número de campos a visualizar ^(55,60).

La tinción de ZN puede detectar la presencia BAAR del género *Mycobacterium* en la muestra siempre que haya 5.000- 10.000 bacilos/ ml, no siendo específica de la presencia de MTB. Su sensibilidad varía entre 40- 60%, existiendo así casos de TB con baciloscopia negativa que no deben descartar la enfermedad, que se confirmará tras cultivo y casos con presencia de BAAR donde no se debe descartar la presencia de una MNT. El recuento del número de BAAR en la muestra utilizando un método semicuantitativo que informe entre una cruz (1+) a cuatro cruces (4+), servirá para valorar la eficacia del tratamiento ya que el número de BAAR irá reduciéndose si el

tratamiento es eficaz. Ello puede tardar más o menos dependiendo de la carga bacilar inicial de las lesiones ⁽⁶¹⁾.

Identificar los casos bacilíferos es un punto clave en el control de la cadena epidemiológica, ya que se trata de los pacientes más contagiosos y su detección es objetivo básico preferente en todos los programas de lucha contra la TB. Como la eliminación de BAAR en las secreciones respiratorias es irregular, deben estudiarse al menos 3 muestras de buena calidad obtenidas en diferentes días antes de considerar al paciente como no bacilífero. En las formas de TBEP, el rendimiento de la baciloscopia es bastante más bajo y siempre inferior a la de los casos pulmonares ^(37,62).

1.4.2.- Técnicas de cultivo. De la siembra en Löwenstein- Jensen a los actuales sistemas automatizados en medio líquido.

El cultivo de la muestra clínica en medios adecuados para MTB es el método de referencia para el diagnóstico de confirmación de la TB ⁽⁵⁴⁾. Se debería pues, incluir estos medios en la rutina diagnóstica de TB, tanto en baciloscopias positivas, para confirmación de especie y estudios de sensibilidad, como en las negativas por la sensibilidad de la tinción. El cultivo ha mostrado ser más sensible (100 ufc/ ml) que el examen microscópico. Permite además la identificación de la especie causal y la realización de estudios de sensibilidad frente a tuberculostáticos, pudiendo así monitorizar el tratamiento y curación del paciente ⁽⁶³⁾.

Sin embargo, la necesidad de confirmación, tras cultivo, de una TB ha sido clásicamente un inconveniente, debido a la lentitud y al tiempo de demora que supone el crecimiento de *Mycobacterium* spp. para obtener un resultado positivo. *M. tuberculosis* es un microorganismo exigente que requiere de 2 a 6 semanas o incluso más para tener resultado visible macroscópicamente en los medios de cultivo habituales sólidos de Löwenstein- Jensen (LJ) utilizados en la rutina convencional ⁽⁶⁴⁾

Por ello, uno de los objetivos actuales es el de disminuir el periodo de incubación hasta obtener masa bacteriana. Para ello, en las pautas actuales se utiliza asociado o

no a la siembra en LJ la inoculación de la muestra tratada en medios líquidos enriquecidos incubados en sistemas automatizados para disminuir el tiempo de positividad ⁽⁶⁵⁾. Así, desde 2007 la OMS recomienda el uso de métodos de cultivo líquido tanto para cultivo como para pruebas de sensibilidad a fármacos ⁽⁵⁹⁾. Los sistemas de cultivo líquidos comerciales y los métodos moleculares desarrollados y respaldados por la OMS y la CDC son los recomendados en las pautas de detección rápida de resistencias a los fármacos antituberculosos ⁽⁶⁶⁾.

La negativización del cultivo se utiliza como principal criterio para hablar de “curación microbiológica”. Para ello, se puede aplicar una pauta de petición de estudio realizando cultivos bimensuales de esputo o aplicar el criterio de procesar en pacientes bacilíferos y/ o cuando se considere necesario por criterios clínicos muestras para cultivo y baciloscopia a los 15 días, a los 30 días y a los dos meses del inicio del tratamiento^(61,65). A partir de los resultados de baciloscopia y/ o crecimiento del cultivo se podrá así evaluar la eficacia de tratamiento y en su caso curación microbiológica.

Medios de cultivo para MTB:

- a) *Medios sólidos:* Medio de Löwenstein- Jensen (LJ). El medio de LJ o sus variantes contienen huevo, fécula de patata, sales, glicerol y un agente inhibidor como es el verde de malaquita. En estos se consigue una buena recuperación de gran parte de las especies micobacterianas, incluyendo *M. tuberculosis*. Las pruebas fenotípicas clásicas de identificación se realizan a partir de masa bacteriana obtenida tras crecimiento en este tipo de medios ^(64,67).

- b) *Medios líquidos:* (MGIT, BactT/ Alert MB). Son medios enriquecidos que recuperan *M. tuberculosis* en mayor número y de forma más rápida que los medios sólidos ⁽⁶³⁾. Por eso, se aconseja incluirlos para el aislamiento primario desde muestras clínicas. Estos medios se pueden utilizar también, a partir de la masa obtenida, para diversas pruebas de identificación y de sensibilidad a antimicrobianos. Su desventaja es el no poder visualizar la morfología de la colonia ni valorar los posibles cultivos mixtos. En la actualidad, ante sospecha de TB se debe incluir el cultivo en medios líquidos al utilizar sistemas totalmente

automatizados de incubación y lectura y en los que pueden realizarse pruebas de sensibilidad “in vitro” a los antimicrobianos ⁽⁵²⁾.

Un ejemplo de este tipo de cultivos es el medio de MGIT (*Mycobacterial Growth Indicator Tube*), basado en un Middelbrook 7H9 con un componente fluorescente (pentahidrato de rutenio) embebido en silicona. Bajo la luz ultravioleta el crecimiento se aprecia mediante la visualización de un brillo fluorescente anaranjado en la superficie y en el fondo del tubo como consecuencia de una depleción de O₂. Es un medio que permite tanto una lectura manual con una fuente de luz ultravioleta o automatizada cuando se incuba en sistema BACTEC MGIT 960. Como todo medio líquido el MGIT tiene el inconveniente de su manipulación, al tenerle que añadir suplementos de antibióticos y/ o de enriquecimiento ⁽⁶⁸⁾, lo que puede incrementar la probabilidad de contaminaciones, mientras que presentan la ventaja de un mayor rendimiento, disminuyendo el tiempo de positividad de los cultivos sólidos en LJ ⁽⁶⁷⁾.

Con los sistemas de cultivo en medios líquidos automatizados, BACTEC MGIT 960 se necesitan menos de 15 días para informar los resultados de resistencia a fármacos ⁽⁶⁹⁾, a diferencia de los métodos fenotípicos convencionales en LJ ⁽⁷⁰⁾, donde se tardan semanas en definir el perfil de resistencia debido a la baja tasa de crecimiento de la bacteria ⁽⁷¹⁾.

1.4.3.- Identificación de especie aplicando técnicas rápidas y/ o moleculares.

Las técnicas fenotípicas desde crecimiento en LJ para diagnóstico de MTB utilizan las pruebas bioquímicas para la identificación clásica de las especies, conllevando una demora importante de tiempo. Por ello, la aplicación de métodos moleculares aplicados a diagnóstico micobacteriano o de nuevas alternativas rápidas de presencia de antígenos específicos en cultivos líquidos para la identificación de MTB pueden ser útiles para mejorar el rendimiento ^(11,65,72).

Para la identificación de MTB se han utilizado durante mucho tiempo métodos bioquímicos convencionales basados en la producción de niacina, catalasa

termoresistente y reducción de nitratos a partir de masa tras crecimiento en medio de cultivo. Si se utilizan medios líquidos se recomienda hacer el subcultivo a medios sólidos o esperar el crecimiento de masa suficiente en el LJ para su posterior identificación.

Estas pruebas requieren al final un tiempo de varias semanas, aumentando la demora diagnóstica ^(11,59). Un dato “preliminar” de posible presencia de MTB a partir de crecimiento en cultivos líquidos es la formación característica, visualizable al microscopio, del “cord factor”. Este se produce por el ácido micólico que contiene moléculas tales como trehalosa 6, 6'-dimicolato, un componente de la pared celular de micobacterias, característico de MTB ya que las MNT no lo producen ⁽⁶⁸⁾.

Un importante avance respecto a la identificación rápida y fácil de MTB en los últimos años ha sido la introducción de una técnica de inmunocromatografía (IC) que detecta el antígeno MPT64, fracción proteica micobacteriana de 24 kDa secretada específicamente por el complejo *M. tuberculosis* durante el crecimiento en el cultivo líquido. Este MPT64 es altamente específico para el complejo *M. tuberculosis*, incluyendo a *M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. bovis*, aunque se han detectado falsos negativos con algunas cepas de *M. bovis* BCG ⁽⁶⁵⁾.

La OMS recomienda que, aunque haya que mantener como referencia los métodos convencionales de cultivo, se deben aplicar sistemas rápidos y asequibles para disminuir el tiempo necesario en la identificación a nivel de especie de MTB y en su caso de MNT ^(56,59). Así, la lentitud de estos métodos convencionales y la necesidad de disminuir el tiempo para un diagnóstico de TB ha hecho que en los últimos años la identificación haya pasado a métodos comerciales basados en sondas de hibridación quimioluminiscentes o más recientemente a métodos de identificación basados en técnicas de PCR- hibridación o de PCR en tiempo real ⁽⁵⁵⁾.

Estos métodos moleculares de identificación de especie dentro del género *Mycobacterium* son muy precisos y fiables, aunque requieren laboratorios de micobacterias equipados con personal capacitado, resultando costosos para países con escasos recursos ⁽⁷³⁾. Sin embargo, el enorme desarrollo de este campo en los últimos años nos ha llevado a poder disponer de diversos “kits comercializados” para la detección directa e identificación de la especie implicada, tanto desde la masa crecida

como incluso directamente de muestra clínica, a partir de la aplicación de técnicas de amplificación ^(52,74).

La introducción en las pautas de rutina diagnóstica de TB de estos métodos moleculares muestra cifras de sensibilidad variables, según publicación y tipo de muestras utilizadas, desde un 95- 100% en baciloscopias positivas a cifras más bajas dependientes del tipo de ensayo ⁽⁷⁵⁾. Sin embargo, a pesar de las distintas sensibilidad y especificidad entre métodos y ensayos, parece claro que en la actualidad el poder utilizar métodos de amplificación por PCR en tiempo real, ofrece una alternativa versátil y realizable en condiciones de rutina asistencial ⁽⁷⁶⁾.

La OMS en 2010 autorizó el método molecular GeneXpert MTB/ RIF para su uso en pacientes con sospecha de TBP en áreas de alta prevalencia de VIH o de elevada resistencia a los tuberculostáticos ⁽⁷⁷⁾. GeneXpert MTB/ RIF es un test molecular totalmente automatizado de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) diseñado para detectar la presencia de *M. tuberculosis* y la resistencia a rifampicina, ofreciendo una mayor sensibilidad en la detección de la enfermedad con un diagnóstico reducido de tiempo, entre 2 y 4 horas ^(78,79,80).

1.5.- Estudios de sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* complex. Una necesidad pautable.

El tratamiento de la TB se basa en la asociación de fármacos para evitar selección de cepas mutantes y su administración correcta durante meses para prevenir la resistencia de *M. tuberculosis* y evitar recidivas. Sin embargo, la única manera de erradicar la TB es interrumpir su cadena de transmisión mediante la curación del enfermo contagioso, lo que refuerza más la conveniencia de su diagnóstico precoz ⁽³⁴⁾.

Con la utilización frente a la TB de pautas de manejo e indicación adecuada de los tuberculostáticos se consiguió inicialmente que ésta fuera una enfermedad tratable y curable en muchos de los casos, usando aquellos fármacos de primera línea siguiendo las distintas pautas establecidas. Sin embargo, la aparición de cepas de *M. tuberculosis*

con resistencia a estos fármacos han convertido de nuevo esta enfermedad en una amenaza y un reto para la salud pública a nivel mundial ⁽¹⁾. Pero incluso en estos casos de TB con patrones extensos de resistencias, se pueden conseguir resultados adecuados utilizando alternativas con fármacos de segunda línea, siempre que se disponga de un rápido diagnóstico de caso MDR-TB para realizar un tratamiento dirigido adecuado en base a los patrones de resistencia. El diagnóstico rápido de resistencia, su adecuado manejo clínico y la aplicación de alternativas de estos casos es esencial para la posibilidad de éxito terapéutico ⁽¹⁶⁾.

La aparición de resistencias a los fármacos se atribuye generalmente al no cumplimiento del tratamiento del paciente con la norma de múltiples fármacos. La adquisición de resistencias es un proceso por etapas y la evolución de la MDR-TB de un aislado a la XDR-TB no es del todo infrecuente ⁽⁸¹⁾. *M. tuberculosis* adquiere resistencia a los antibióticos principalmente a través de mutaciones cromosómicas que, o bien afectan directamente el sitio de unión del fármaco o mutan enzimas bacterianos implicados en la activación de un fármaco ^(82,83).

Las pruebas iniciales de sensibilidad para *M. tuberculosis* complex deben incluir todos los tuberculostáticos de primera línea: isoniacida (H), rifampicina (R), pirazinamida (Z), etambutol (E) y estreptomina (S), ya que son los que forman parte de los distintos esquemas terapéuticos actualmente recomendados para la mayoría de los pacientes⁽⁸⁴⁾. El estudio de sensibilidad para fármacos de segunda línea tanto clásicos como más recientes (cicloserina, etionamida/ proeonamida, ácido para- amino salicílico, kanamicina, amikacina, capreomicina, rifamicinas, levofloxacino, moxifloxacino) debe reservarse para establecer las pautas de tratamiento más adecuadas en base a la resistencia a los fármacos de primera línea ^(34,83,85).

En la actualidad, se recomienda en nuestro medio, ante un caso de TB, realizar un cultivo para aislamiento y posterior estudio de sensibilidad a fármacos de primera línea. Si se detectan resistencias (en especial a rifampicina) el estudio de sensibilidad se debe ampliar a fluoroquinolonas y fármacos inyectables de segunda línea que se vayan a utilizar en el tratamiento de rescate que se va a ofrecer al enfermo (levofloxacino/ moxifloxacino y amikacina/ capreomicina en el caso de España). La fiabilidad del resultado de una prueba de sensibilidad convencional a todos estos

fármacos es adecuar y, por lo tanto, debe ser orientativa en la pauta de tratamiento recomendado. Además, se puede reforzar en la actualidad con técnicas moleculares para detección de mutaciones en el caso de rifampicina en el gen *rpoB*, para la isoniacida en los genes *katG* e *inhA*, para las fluoroquinolonas en *gyrA*, *gyrB*, para aminoglicósidos/cíclicos peptídicos en *rrs* y *eis* y en el etambutol en *embB* ^(83,85).

Las distintas pautas recomendadas para tratamiento de TB se resumen en la tabla 1.3, clasificándose según el tipo de clínica o factores de paciente. En los casos no complicados sin factores de riesgo asociados, el tratamiento recomendado universalmente es el de la pauta de 6 meses con los tuberculostáticos de primera línea: 2 meses con rifampicina (R), isoniacida (H), pirazinamida (Z) y etambutol (E), seguidos de 4 meses con R y H (2RHZE/ 4RH). En casos paubacilares, excepcionalmente, podría utilizarse tratamiento con tres fármacos (RHP) en fase inicial ^(6,86,87).

Tabla 1.3.- Pautas de fármacos recomendados para tratamiento inicial de tuberculosis en situaciones clínicas distintas ⁽⁶⁾.

Tipo de tuberculosis	Pauta
<ul style="list-style-type: none"> • TB Pulmonar y Extrapulmonar - Tratamientos iniciales alternativos - Situaciones especiales (gota, hepatopatía crónica) 	2 HRZE/ 4HR* / ** 2 HRZS/ 4HR - 2HRE/ 7HR 2HRE/ 7HR
<ul style="list-style-type: none"> • TB meníngea/Tuberculoma 	2 HRZE/ 10HR
<ul style="list-style-type: none"> • TB en pacientes con afectación neurológica/ silicosis y/o espondilitis 	2 HRZE/ 7HR

E: etambutol; H: isoniacida; R: rifampicina; S: estreptomina; Z: pirazinamida

*Cuando el antibiograma demuestra sensibilidad a todos los fármacos se podría retirar E.

**Si no es posible utilizar E puede sustituirse por S (2HRPS/ 4HR)

En el caso de TB en pacientes con XDR-TB el tratamiento debe ser individualizado, guiado por el resultado del antibiograma y basado en la historia de tratamiento previo y posibles abandonos. Se recomienda utilizar un agente inyectable (kanamicina, capreomicina) durante los 6 primeros meses e incluir una fluoroquinolona como fármacos de segunda línea. Si la cepa es sensible al etambutol éste se debe mantener durante todo el tratamiento. Al menos se deben emplear 4 fármacos eficaces y se deben prolongar hasta cumplir los 18 meses, con confirmación además e negativización de cultivos ⁽⁸⁸⁾. A los pacientes con tratamiento se debería realizar un

mínimo de un control mensual durante la fase intensiva del tratamiento y cada uno o 2 meses en la fase de continuación ⁽¹⁶⁾.

En la última década el desarrollo de fármacos para la tuberculosis ha evolucionado extraordinariamente. Se están reevaluando fármacos ya conocidos y además han aparecido nuevos compuestos que están siendo investigados y se encuentran en diferentes fases de su desarrollo para el tratamiento de la TB multirresistente, las diarilquinolinas, nitro- dihidro- imidazo- oxazoles, benzothiazinonas, dinitrobenzamidas, dipiperidinas y capuramicinas son ejemplos de ellos. La bedaquilina (diarilquinolina), obtuvo en diciembre de 2012 la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), al igual que la delamanida (nitro- dihidro- imidazo- oxazoles). Teniendo en cuenta sus propiedades tan favorables en relación con eficacia y seguridad, en pocos años podrían representar un cambio a la hora de abordar el tratamiento de estos pacientes, con posibilidad de emplear regímenes con una duración más corta y con menos efectos secundarios que los actualmente utilizados ^(89,90).

1.5.1.- Métodos fenotípicos de sensibilidad a tuberculostáticos y su vigencia.

Resulta recomendable, siempre que sea posible, realizar el estudio de sensibilidad a los tuberculostáticos, al menos de primera línea, a todos los casos nuevos detectados, pudiendo así controlar la presencia de cepas resistentes. Para ello, hoy en día existen diferentes sistemas comerciales estandarizados que permiten la realización del antibiograma de forma relativamente sencilla, siempre en laboratorios con experiencia y con los controles de calidad adecuados o en el caso de imposibilidad enviar las cepas aisladas o incluso la muestra a un laboratorio de referencia ⁽⁹¹⁾.

Aunque, el antibiograma por el método de las proporciones de Canetti (1963) ⁽⁷⁰⁾ ha sido la técnica estándar utilizada para la detección “in vitro” de la resistencia de los aislados de *M. tuberculosis* a los fármacos de primera línea, su demora en los resultados al hacerse una primera lectura a los 28 días ha llevado a sustituir este por los sistemas automatizados de lectura continua de medio líquido, como es el caso de BACTEC MGIT

960 donde se obtienen resultados entre 3- 13 días ⁽⁹²⁾. Así, los métodos empleados se basan en la actualidad en pautas en medio líquido en sistemas automatizado (MGIT 960 SIRE- P) donde las concentraciones y la lectura están estandarizadas.

En el caso de que el sistema utilizado detecte resistencia a alguno de ellos es importante su confirmación, bien repitiendo el ensayo o en su caso enviando la cepa a un centro de referencia, descartando siempre antes las posibles falsas resistencias por contaminación de la muestra. La pauta normal exige, por tanto, la confirmación de la resistencia, la ampliación de rangos de concentraciones en estos fármacos y la utilización, si es necesario y se dispone de ello, de métodos moleculares. Si se detectaran casos de resistencia tipo MDR-TB estará entonces indicada la realización de antibiograma frente a fármacos de segunda línea para confirmar la posible presencia de cepas XDR-TB ⁽⁸⁸⁾.

Sin embargo, en el caso de fármacos de segunda línea, en la actualidad no existen todavía técnicas estandarizadas aceptadas universalmente para ellos y no todos los laboratorios realizan estos estudios de forma adecuada. En este caso se deberá recomendar enviar el aislamiento a un centro de referencia para confirmación de sensibilidad de estos fármacos ⁽⁹³⁾.

1.5.2.- Métodos moleculares y resistencia a tuberculostáticos: inclusión en las pautas.

La detección de resistencias a tuberculostáticos mediante técnicas moleculares consigue datos más precoces, lo que puede llevar a una mejora de la eficacia. En la actualidad estas técnicas se utilizan en la detección de resistencias a fármacos de primera línea de forma habitual y con buenos resultados, siendo también aplicables a los de segunda línea, pero con resultados mucho más limitados ⁽⁷¹⁾.

Esta metodología molecular, cada vez más introducida en la práctica microbiológica persigue la detección de mutaciones en genes específicos de *M. tuberculosis*. En más del 95% de los casos la resistencia a rifampicina (R), está que son

debidas a la alteración de la subunidad beta del ADN polimerasa, causada por la mutación localizada comúnmente en la región de 81 nucleótidos del gen *rpoB*. El 60-65% de las resistencias a isoniacida (H) se han relacionado con la región específica S315T en el gen *katG* y/ o con la región intergénica *mabA-inhA* ⁽⁹⁴⁾. En el caso del etambutol (E) el 50% de las resistencias se detectan en las mutaciones del gen *embB*. El 55% de los aislados resistentes a estreptomina (S) se han relacionado en los genes *rrs* y *rpsL* y el 94% de los casos con resistencia a la pirazinamida (Z) se localizan en el gen *pncA* ^(95,96). Estos estudios moleculares poseen la ventaja de poderse aplicar no sólo sobre masa aislada en cultivo, con sensibilidad cercana al 100%, sino incluso utilizarse sobre muestra clínica directa, especialmente cuando la baciloscopia es muy positiva para obtener una mejor sensibilidad ⁽⁹³⁾.

En la última década, las pruebas moleculares se han desarrollado para identificar las mutaciones que confieren resistencia a algunos fármacos de primera e incluso de segunda línea. Se aplican técnicas de PCR en tiempo real para detección de mutaciones bien directa o con posterior hibridación, adaptadas la mayoría para aplicar sobre muestra directa de paciente o sobre crecimiento tras cultivo. Al ser isoniacida y rifampicina los fármacos más importantes en el tratamiento, la mayoría de estos métodos incluyen la detección de las mutaciones asociadas a resistencias en estos dos fármacos. La disponibilidad de detección de resistencias a rifampicina por PCR en tiempo real, aplicar sistemas de “microarrays” o técnicas de secuenciación, para detectar simultáneamente distintas mutaciones a diferentes fármacos, hace que al final se pueda confirmar cada una de las resistencias que una cepa concreta tenga y/ o exprese a cada uno de los fármacos ⁽⁹⁷⁾.

Sobre muestra directa el método más utilizado, con buenos valores predictivos en especial sobre muestras de esputos o broncoscoaspirados en casos de sospecha clínica de tuberculosis activa es la de PCR en tiempo real ^(80,98). Basado en ello, a finales de 2013, la OMS amplió sus recomendaciones sobre el uso de esta metodología en concreto para GeneXpert MTB/ RIF, incluyendo así tanto la rápida detección de casos de TB como la detección de resistencia a rifampicina ⁽⁹⁹⁾. Las posibles indicaciones de PCR en tiempo real para detección de mutaciones de resistencia a rifampicina, de muestra directa del paciente tanto en muestras con baciloscopia positiva como incluso negativa quedarían así resumidas: i) pacientes procedentes de países con elevada tasa

de resistencia; ii) fracaso terapéutico; iii) sospecha de contagio de cepa resistente; y iv) pacientes con antecedentes de tratamiento previo según caso concreto. Sería por tanto de interés el realizar esa detección de posible resistencia a rifampicina al menos a todo caso nuevo de TB en nuestro entorno ^(100,101).

Utilizando metodología de PCR- hibridación basada sobre tiras de nitrocelulosa a partir de especies de *M. tuberculosis* complex, sistemas como el GenoType® MTBDR_{plus} (Hain Lifesciences, Nehren, Alemania) detecta mutaciones en el gen *rpoB*, (resistencia a rifampicina) y/ o *katG* y promotor *inhA*, (resistencia a isoniacida), mientras que la versión MTBDR_{s/} V.1.0 detecta mutaciones en el gen *gyrA* (resistencia a las fluoroquinolonas), el gen *rrs* (resistencia a aminoglicósidos/ péptidos cíclicos) y el *embB* (resistencia a etambutol) ^(9,102). Para mejorar el rendimiento global de MTBDR_{s/} V.1.0, se diseñó una nueva versión la MTBDR_{s/} V.2.0 en la que aumenta la sensibilidad para la detección de resistencias a kanamicina y fluoroquinolonas, incluyéndose dos nuevas regiones genéticas: la región del promotor *eis* (además de *rrs*) y el gen *gyrB* (además de *gyrA*) ⁽⁷¹⁾.

1.5.3.- Aplicación de la secuenciación genómica en *Mycobacterium tuberculosis*.

La aplicación de la secuenciación genómica en *Mycobacterium tuberculosis* ayuda a los esfuerzos a nivel mundial en el desarrollo de nuevas vacunas, diagnóstico, tratamiento y prevención ⁽¹⁰³⁾. La aparición de tecnologías de secuenciación masiva puede superar las limitaciones de los diagnósticos moleculares actuales y en un futuro ser un método de referencia como ya lo está empezando a ser para la epidemiología de la enfermedad ⁽¹⁰⁴⁾.

Uno de los primeros genomas bacterianos completamente secuenciados, abriendo así las puertas de la era genómica en el estudio de la tuberculosis fue la cepa de referencia H37Rv y su variante avirulenta H37Ra. La secuencia completa del genoma de H37Rv determinó y mejoró la comprensión de la biología de este patógeno y su manipulación ha permitido un gran número de descubrimientos para el desarrollo de nuevos antibióticos, vacunas y diagnóstico clínico. El tamaño del genoma completo de

M. tuberculosis es de algo más de 4,4 millones de pares de bases, alrededor de 4.000 genes y un contenido elevado de guanina y citosina (65,6%) ⁽¹⁰⁵⁾.

Para los estudios genómicos de *M. tuberculosis* y de la mayoría de bacterias se aplica la tecnología de secuenciación por síntesis de Illumina (SBS, Sequence By Synthesis). La aproximación más usada para generar las librerías de secuenciación es por fraccionamiento enzimático del ADN. Esta técnica se basa en la realización de bibliotecas genómicas, colección de ADN genómico a partir de un sólo organismo, utilizando una transposasa, diseñada para fragmentar y etiquetar el ADN simultáneamente añadiendo los adaptadores y una reacción de PCR para amplificación del ADN de inserción con la agregación de cebadores e índices de secuenciación en ambos extremos del ADN. Posee las ventajas de necesitar una baja concentración de ADN, con tan sólo 1ng total es suficiente y un tiempo de preparación corto, aunque en el caso de *M. tuberculosis* resultan difíciles de secuenciar por el gran contenido que tienen de regiones de guanina y citosina ⁽¹⁰⁶⁾.

Entre los avances en el estudio de la evolución de las micobacterias que se ha conseguido mediante esta metodología destacan:

a) Estudios filogenéticos.

Uno de ellos, son los estudios filogenéticos y filogeográficos con los cuales, se ha podido demostrar que el posible origen de *Mycobacterium tuberculosis* complex fue en África, por lo menos, hace 70.000 años, y que se comenzó a dispersar junto con las primeras grandes migraciones humanas. Como resultado, hoy en día, se conoce que existen diferentes linajes que divergen en distintas regiones geográficas. Existen siete grandes linajes que comprenden la diversidad de *Mycobacterium tuberculosis* complex y dentro de cada uno de ellos se encuentran varios sublinajes. El grupo formado por las cepas más “modernas” incluye tres linajes separados: Linaje 4 (Euro- Americano), Linaje 2 (Este asiático) y Linaje 3 (Este de África y Asia central). Mientras que, las cepas más “ancestrales” y menos virulentas incluyen: Linaje 1 (Indo- Océánico) y los Linajes 5 y 6 (Oeste de África), comúnmente conocidos como *M. africanum*. El Linaje 7 es exclusivo de Etiopía ^(107,108).

Las cepas del linaje 1 son las menos virulentas y no están relacionadas con grandes brotes de transmisión. El Linajes 2 es el más común y el que mejor se transmite entre individuos de origen asiático, son las cepas más virulentas y tienden a desarrollar resistencias más rápido, este linaje está asociado a resistencias. El Linaje 4 es el más común, estas cepas son responsables de la mayoría de los casos de tuberculosis humana que ocurren actualmente en el mundo y de los brotes de tuberculosis multirresistente a los antibióticos. Dentro del Linaje 2 existen dos sublinajes el linaje Beijing y el protobeijing y dentro del Linaje 4 se han descrito 10 sublinajes (L4.1.1: X, L4.1.2: Haarlem, L4.1.3.3: Ghana, L4.2: Ural, L4.4, L4.3: LAM (Latin American Mediterranean), L4.5, L4.6.1: Uganda, L4.6.2: Cameroon, L4.10: PPG3) de ellos los más frecuentes son el sublinaje Haarlem, LAM y PPG3 ^(108,109,110).

Los diferentes linajes de humanos demuestran diferencias fenotípicas tanto a nivel de la bacteria como a nivel clínico y epidemiológico. Posiblemente estas diferencias se deben a que cada linaje ha coevolucionando adaptándose junto a las diferentes poblaciones humanas, por ello, la bacteria no es fenotípica ni genéticamente homogénea. Esta información permite la definición objetiva de grupos jerárquicos desde linajes a sublinajes ^(109,110).

b) Estudios de la biología de *M. tuberculosis*.

El análisis del genoma de cepas de *M. tuberculosis complex* ofrece información sobre la biología del bacilo de la TB durante la infección, Coscolla *et al.* demostraron que los epítomos de las células T contra *Mycobacterium tuberculosis complex* están hiperconservados, es decir, el bacilo no acumula mutaciones para escapar del sistema inmune ^(111,112). La secuenciación genómica ayuda a entender los determinantes genéticos de los cambios fenotípicos lo que a su vez permitirá determinar si deben o no ser tenidos en cuenta en el desarrollo de nuevos antibióticos, diagnósticos y vacunas para controlar la enfermedad de la TB ⁽¹⁰⁴⁾.

c) Desarrollo de nuevos marcadores epidemiológicos.

Otra ventaja del análisis de genomas completos es que permite descubrir y desarrollar nuevos marcadores para vigilancia epidemiológica o diagnóstico clínico:

- La epidemiología genómica se basa en la diferencia de cambios nucleotídicos o SNPs (Polimorfismo de un Nucleótido) entre cepas. Walker *et al.* ⁽¹¹³⁾ determinaron que 12 SNPs, es el límite para definir casos de transmisión; mientras que los pacientes con relaciones epidemiológicas bien definidas tienen menos de 5 SNPs de diferencia, mayoritariamente reflejan una transmisión mucho más reciente ⁽¹¹⁴⁾. Sabiendo que un SNP corresponde a una variación en la secuencia de ADN de un sólo nucleótido que afecta a una sola base. A partir de una secuencia del genoma se podrá saber si se trata de un caso de transmisión o no aplicándose el criterio general de cantidad de SNPs. Si una cepa tiene 12 o más SNPs diferentes a otra no se considera caso de transmisión, mientras que si una cepa tiene menos de 12 SNPs iguales a otra se considera caso de transmisión.

- Se podrá conocer también mediante secuenciación genómica la diversidad de la bacteria dentro de un mismo paciente (heterogeneidad), donde coexisten poblaciones bacterianas resistentes y sensibles. Este estado mixto de alelos sensibles y resistentes es conocido como heterorresistencia. Las poblaciones bacterianas que infectan a un paciente no es genéticamente homogénea, por ello interesa saber cuál es la magnitud de dicha heterogeneidad. A partir del estudio de muestras seriadas se ha podido definir la aparición durante el tratamiento de diferentes resistencias asociadas a antibióticos. Se ha podido demostrar que hay pacientes donde inicialmente coexisten diferentes mutaciones dando resistencia a un antibiótico. En general, al inicio del tratamiento dichas subpoblaciones y sus mutaciones asociadas están presentes con una baja frecuencia respecto a la población de TB sensible y conforme avanza el tratamiento alguna de ellas puede ser seleccionada casualmente ^(82,104).

- Otra de las aplicaciones que nos permiten estos métodos es determinar la frecuencia con la que los episodios en un mismo paciente se deben, pudiendo diferenciar entre caso de coinfección, recidiva o reinfección, o bien si es la misma cepa que dio lugar al episodio original. Esta es una información importante para el clínico a la hora de evaluar el tratamiento. Al comparar el aislado original con el del segundo episodio, si el número de

SNPs encontrados es menor de 12 se clasifica como recidiva, pero si tiene más de 12 SNPs probablemente sea un caso de reinfección/coinfección^(114,115).

d) Análisis de resistencias.

La secuencia genómica proporciona un perfil completo de cambios nucleotídicos asociados a resistencias. En la actualidad existe un panel de más de cien mutaciones asociadas a resistencias contenidas en 24 genes ⁽¹⁰⁴⁾. El mecanismo principal para la adquisición de resistencia en *M. tuberculosis* es la acumulación de mutaciones puntuales en genes diana de los diferentes fármacos antituberculosos. La aparición de poblaciones resistentes a los medicamentos surge por la presión positiva y selección de mutantes durante un tratamiento inadecuado ⁽¹¹⁶⁾.

Pero, todavía existen varias limitaciones para usar la secuenciación genómica como único método de detección de resistencias ya que no se conocen todas las mutaciones que confieren resistencia. Para la rifampicina se sabe que el 95% de las mutaciones ocurren en lo que se conoce como "rifampicin resistance determining region" (RRDR). Este porcentaje se reduce al 85% ⁽¹¹⁷⁾ cuando se habla de la isoniacida o incluso menos si se trata de otros fármacos. Además, las pruebas de sensibilidad para la pirazinamida o el etambutol no están 100% estandarizadas lo que hace la asociación estadística entre resistencia fenotípica y genotípica resultante más complicada. El problema es que la asociación de mutaciones a resistencias depende de una buena caracterización fenotípica. En el caso de la pirazinamida el estudio fenotípico muchas veces produce resultados contradictorios, debido al medio acidificado necesario para la actuación del fármaco ⁽¹¹⁸⁾.

Aun así, la gran mayoría de dichas resistencias se han encontrado en el gen *pncA* que es el único que claramente se ha asociado a resistencias a pirazinamida. El caso del etambutol también es paradigmático debido a que las mutaciones todavía no están bien descritas, la mutación predominante se encuentra en el codón *embB* en la posición 306, pero con los últimos estudios se están descubriendo otras mutaciones en los codones *embB* en las posiciones 406, 378 y 328 y también en los codones *embA*, *embC* ^(119,120,121,122).

En el caso de la rifampicina se han obtenido con la secuenciación interesantes avances con la detección de mutaciones compensatorias del gen *rpoB*. Más del 95% de las cepas clínicas resistentes de *M. tuberculosis* tienen una mutación en la región de *rpoB*, posición S450L (o S531L si usamos la notación de *E. coli*), que codifica la subunidad β de la ARN polimerasa. Asociadas a esta mutación se han encontrado mutaciones secundarias en las otras subunidades de la polimerasa *rpoA* y *rpoC*. Estos genes codifican las subunidades α y β' de la ARN polimerasa respectivamente.

Estas mutaciones como describe Comas *et al.* ⁽¹²³⁾ en su trabajo puede que no confieran resistencias a antibióticos, pero sí que compensan por la pérdida de eficacia asociada a las mutaciones de resistencia a antibióticos en el gen *rpoB*, ya que las cepas resistentes a los medicamentos tienen un *fitness* reducido en comparación con las cepas sensibles, en este estudio sugieren que el coste de adecuación de la resistencia a los antimicrobianos se puede reducir mediante estas mutaciones compensatorias. La adquisición de mutaciones en *rpoA* y *rpoC* conlleva a la aparición de cepas de *M. tuberculosis* con multiresistencia de mayor complejidad y una alta aptitud competitiva in vitro. Estas mutaciones aparecen sobre todo en los países con una tasa de incidencia de multiresistencia más alta ⁽¹²³⁾.

Por todo lo comentado, se puede resumir que en la actualidad la secuenciación genómica, aunque nos proporciona grandes avances, de momento sigue siendo un complemento de los actuales protocolos de diagnósticos para tuberculosis. El tiempo dirá si puede o no sustituir al cultivo para ciertas situaciones y si es o no coste/ efectivo.

La verdadera revolución genómica en la microbiología clínica vendrá con la identificación de la secuencia genómica no desde un cultivo sino directamente a partir de la muestra clínica. Por el momento, la secuenciación genómica todavía tiene un uso limitado a nivel de diagnóstico clínico. Las mutaciones asociadas a fármacos de primera línea se pueden determinar mientras que de las mutaciones asociadas a fármacos de segunda línea no se sabe casi nada, por ello, el diagnóstico molecular de detección de resistencias es todavía uno de los grandes problemas que existe debido a que sigue siendo alto el porcentaje de mutaciones asociadas a resistencias que no conocemos⁽¹⁰⁴⁾.

2.-Hipótesis de trabajo y Objetivos

La enfermedad tuberculosa se mantiene en la actualidad como un importante problema de salud pública, no solo a nivel mundial sino también en nuestro medio, a pesar de las múltiples medidas de actuación aplicadas en las últimas décadas para intentar disminuir su incidencia.

El control adecuado de esta patología infecciosa se asocia, con una disminución en la demora de su diagnóstico clínico de sospecha y/ o su confirmación microbiológica. El poder aplicar pautas de detección precoz de *Mycobacterium tuberculosis* complex introduciendo en la rutina diagnóstica métodos microbiológicos rápidos y eficaces alternativos a las convencionales es una variable que se debería plantear en los laboratorios de micobacterias de un Departamento de Salud siempre que ello sea posible.

Disminuir la demora en el diagnóstico de caso de TB, sobre todo en pacientes bacilíferos, resulta imprescindible para un control efectivo de esta patología, ya que son los que mantienen la cadena de transmisión. Entre los objetivos iniciales para mejorar su diagnóstico se debe incluir la detección, identificación y estudios de sensibilidad de MTB mediante métodos rápidos, válidos y aplicables en la rutina microbiológica. El acercar los casos de TB declarados a partir de sospecha clínica a los diagnósticos de “caso TB confirmado” en el laboratorio es otro objetivo básico de todo programa de control, haciendo posible así el diagnóstico precoz y por tanto un mejor tratamiento y control de los pacientes.

En la situación actual concurren además otras circunstancias que dificultan la eficacia de esta tarea, como son el incremento de casos con la resistencia a fármacos de primera línea, incluyendo isoniacida y rifampicina (cepas MDR-TB), la coinfección por VIH con el problema que supone esta variable en el manejo adecuado del paciente, y la cada vez más frecuente movilidad demográfica, con descripción de TB asociada a inmigración en países desarrollados. La realidad en España y en particular en la Comunitat Valenciana, con tasas de inmigración importantes y porcentajes de coinfección TB- VIH no despreciables, parece mostrarnos que aunque las tasas de incidencia por debajo de 15- 20/ 10⁵ habitantes siguen resultando elevadas existe una tendencia progresiva a la disminución con los años como resultado de la puesta en marcha de un programa nacional de control de TB y de programas más específicos aplicados en las comunidades autónomas en función de sus competencias. Sin

embargo, al comparar estos datos con los de otros países de nuestro entorno parece que todavía queda tarea por hacer.

La resistencia a tuberculostáticos parece por lo publicado, no representar un problema grave en España. Sin embargo, los datos se muestran generalmente de forma parcial, tomados de fuentes distintas y publicados en series no controladas, resultando difícil hacer un diagnóstico correcto de la situación al respecto en este país. Detectar los factores asociados a cada zona geográfica (demora diagnóstica, déficits en el control microbiológico de los casos, ausencia de datos fiables de resistencia, infradeclaraciones, etc...) parece necesario pues para aplicar las medidas más adecuadas en el control de la TB en cada área sanitaria estudiada.

La Comunitat Valenciana, con la implantación y funcionamiento de la RedMiva desde la Conselleria de Sanitat, es un ejemplo de intento de adecuación de recursos en la mejora de la situación de la TB. Los informes anuales publicados desde Salud Pública, en los que se recogen los datos por Departamentos de Salud incluyendo epidemiología, clínica y microbiología, representan una interesante mejora de los sistemas de flujo de información que se supone debería repercutir en un mejor planteamiento para el control eficaz del tema.

Los Servicios de Microbiología de los hospitales de referencia de los distintos Departamentos de Salud de nuestra comunidad realizan la detección e identificación rápida de MTB a partir de las muestras remitidas de pacientes con sospecha. En concreto, el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia, que dispone de atención continuada las 24 horas actúa como centro de referencia del área y es en donde se centralizan todos los diagnósticos antes sospecha de TB del Departamento de Salud Valencia- Dr. Peset. En éste se realizan las pautas de diagnóstico y control microbiológico de TB, adaptadas en el tiempo a la metodología disponible para intentar mejorar la situación de esta patología en este Departamento. Además, se estudia de cada caso su forma de presentación, los factores de riesgo asociados, como coinfección por VIH, relación con inmigración, etc... así como la presencia de cepas resistentes.

Combinando la aplicación de metodología convencional con nuevas alternativas moleculares y valorando los resultados al compararlos con los datos que

nos ofrecen las autoridades sanitarias en forma de Boletín Oficial o con publicaciones del entorno, se conocerá mejor la realidad de la situación de la TB en la zona y el impacto que las modificaciones de los protocolos suponen en la incidencia y tipo de patología tuberculosa, pudiendo así trasladar esta experiencia al entorno para que exista el dinamismo adecuado cuando nos planteamos el control de esta patología.

Los objetivos que se plantean en el trabajo en base a lo descrito sobre el estado actual del tema y a partir de los casos de TB declaradas y confirmadas del Departamento de Salud Valencia- Dr. Peset en el periodo 2005- 2015 (once años) son:

- 1.- Conocer los casos con aislamiento de MTB o MNT y su evolución a lo largo del periodo de estudio en el Departamento de Salud Valencia Doctor Peset, así como las tasas de incidencia de TB confirmadas y su comparación con las declaradas desde la Conselleria de Sanitat en nuestro medio.
- 2.- Analizar la distribución de los casos de TB detectadas según procedencia, variables demográficas (edad, sexo y nacionalidad del paciente) y/ o posibles factores de riesgo asociados (coinfección por VIH, inmigración y localización pulmonar/ extrapulmonar de la enfermedad).
- 3.- Estudiar la rentabilidad de la baciloscopia sobre muestra de paciente y su asociación con cuadro clínico y factores de riesgo asociados (inmigración y/ o VIH positivo).
- 4.- Analizar el impacto que sobre la demora microbiológica pudiera tener la introducción, a lo largo del estudio, de nuevos métodos diagnósticos para identificación de MTB, tanto convencionales como moleculares.
- 5.- Valorar la utilidad y la adecuación de las peticiones solicitadas sobre muestra directa de PCR en tiempo real (GeneXpert MTB/ RIF) para diagnóstico rápido molecular de TB.

6.- Estudiar y analizar las resistencias de los aislados de MTB del área mediante métodos fenotípicos, tanto de forma global como por grupos de riesgo VIH y/ o inmigración.

7.- Valorar la aportación de la secuenciación genómica en el análisis de las cepas de MTB multirresistentes detectadas.

3.-Material y Métodos

3.1.- Diseño y ámbito del estudio.

Se trata de un estudio retrospectivo observacional con intervención en revisión de resultados emitidos sobre datos de pacientes del Departamento de Salud Valencia- Doctor Peset, que acudieron entre los años 2005- 2015 a los diferentes Servicios de Salud del área por sospecha de TB o de micobacteriosis. El diagnóstico de confirmación de TB se centralizó en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Doctor Peset (HUDr. Peset), que actúa como laboratorio de referencia donde se realizan todos los diagnósticos microbiológicos del área.

Este Departamento de Salud (DS) da cobertura sanitaria a la zona sur- oeste de la ciudad de Valencia y a los municipios colindantes situados en la comarca del Horta Sur. El número de habitantes asignados con una media de 368.378 habitantes ha sufrido oscilaciones a lo largo del estudio por los sucesivos cambios de sectorización en la asistencia sanitaria. Los datos de población/ año tomados del SIP y utilizados para los cálculos de la incidencia de TB por año se muestran en la tabla 3.1. El descenso del último año estudiado coincide con la reorganización de los departamentos de Salud de Valencia ciudad con la nueva incorporación del nuevo Hospital La Fe.

Tabla 3.1.- Datos de población/ año que asiste el HUDr. Peset durante el estudio.

Año	Población DS HUDr. Peset
2005	370.860
2006	384.657
2007	394.725
2008	376.449
2009	382.878
2010	377.833
2011	371.071
2012	369.178
2013	370.542
2014	369.577
2015	284.394

El criterio de inclusión inicial de casos fue el de aislamiento de *Mycobacterium* spp. (*M. tuberculosis* complex- MTB o especies de micobacterias no tuberculosas- MNT), en el Servicio de Microbiología a partir de muestras remitidas por sospecha

clínica de tuberculosis o de micobacteriosis en los últimos once años (2005 a 2015 ambos inclusive). A partir de los casos iniciales el trabajo se centró en la recopilación de datos del caso y confirmación y/ o búsqueda de variables epidemiológicas y/ o microbiológicas para un posterior análisis de las tuberculosis confirmadas.

Las variables microbiológicas que se incluyeron fueron: i) baciloscopia; ii) resultado de PCR en tiempo real sobre muestra directa para MTB; iii) crecimiento en los medios de cultivos; iv) pruebas fenotípicas de identificación de especie y demora diagnóstica; y v) estudio fenotípico y/ o genotípico de sensibilidad a tuberculostáticos para cada caso de TB, y demora diagnóstica desde la remisión de la muestra hasta la conclusión definitiva del estudio microbiológico.

La búsqueda de variables epidemiológicas se realizó a partir de revisión de las historias clínicas informatizadas de los pacientes y/ o de los datos aportados por el peticionario en los volantes remitidos a microbiología. Se procedió en todos los casos incluidos a revisar las siguientes variables: edad, sexo, VIH y nacionalidad de cada paciente. La determinación de presencia de anticuerpos anti- VIH 1+2 se realizó en aquellos casos con petición serológica mediante ELISA (Abbott® y BioRad®) y confirmación por Western Blott (BioRad®).

Todos los datos y variables referidas de datos demográficos del paciente, epidemiológicos y microbiológicos fueron introducidas en una base Excel (Microsoft Office Excel 2016) sobre la que se realizó el análisis de los resultados obtenidos en cada caso. En el estudio se consideraron exclusivamente los casos de TB confirmados tras cultivo microbiológico. Sobre esta base se calculó la significación estadística de las variables estudiadas mediante el test del “chi cuadrado” con un p- valor de 0,05 siendo $p < 0,05$ estadísticamente significativo y $p > 0,05$ estadísticamente no significativo. En el caso de estudio de utilidad de técnicas se calculó en tablas de contingencia 2x2. La sensibilidad $[VP / (VP+FN)]$, la especificidad $[VN / (VN+FP)]$, el valor predictivo positivo (VPP) $[VP / (VP+FP)]$ y el valor predictivo negativo (VPN) $[VN / (FN+VN)]$ siendo, VP: verdadero positivo, VN: verdadero negativo, FP: falso positivo y FN: falso negativo.

3.2.- Variables en las definiciones y caracterización de casos del estudio.

3.2.1.- Definiciones de caso de TB.

Los criterios utilizados para definir y clasificar los casos de TB se basaron en las recomendaciones del documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis, donde participan la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) ^(2, 6) y la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) ⁽³³⁾, en los Informes de Tuberculosis de la Generalitat Valenciana de los años 2013 ⁽³⁰⁾, 2014 ⁽³¹⁾ y 2015 ⁽¹⁷⁾ y la Guía para la Vigilancia y el control de la Tuberculosis de la Generalitat Valenciana ⁽³⁴⁾.

En la definición de caso de tuberculosis se considera, siguiendo estas recomendaciones, su diagnóstico de sospecha clínica como su confirmación microbiológica:

a) TB por criterios clínicos:

- Incluye aquellos casos de pacientes con signos, síntomas o datos radiológicos compatibles con TB activa en cualquier localización en la que se ha tomado la decisión médica de administración de un ciclo completo de terapia antituberculosa estándar.
- En los casos con fallecimiento se incluirán aquellos resultados anatomopatológicos en los que las necropsias sean compatibles con TB activa, habiendo requerido de forma similar el anterior tratamiento antituberculoso, antes del exitus.

b) TB por criterios de laboratorio:

- *Caso confirmado:* el que presenta al menos uno de los dos signos: i) aislamiento en cultivo de un microorganismo del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (salvo el Bacilo de Calmette Guérin) en muestra clínica apropiada; ii) detección de ácido nucleico del complejo *M. tuberculosis* en una muestra clínica adecuada junto con baciloscopia positiva por microscopia óptica convencional o fluorescente.

- *Caso probable*: el que cumple al menos uno de los tres criterios siguientes: i) baciloscopia positiva por microscopia óptica convencional; ii) fluorescente, detección del ácido nucleico del complejo de *M. tuberculosis* en una muestra clínica; o iii) presencia histológica de granulomas.

Teniendo presente que no se debe declarar como “caso nuevo” aquellos casos previamente tratados, si no han pasado al menos 12 meses desde la última vez que recibió tratamiento antituberculoso, se definió el concepto “episodio dentro de un caso” como aquellos en los que se produjo un abandono o incumplimiento de tratamiento por parte del paciente, con aislamientos positivos tras 12 meses desde el diagnóstico previo.

En este estudio se analizaron sólo aquellos casos de tuberculosis confirmados microbiológicamente, incluyendo los posibles episodios de un mismo paciente por recidiva o reactivación, con aislamiento de cepas/ caso conservadas a -20°C en alícuotas para posteriores confirmaciones de variables microbiológicas.

3.2.2.- Tipos de TB. Clasificación según variables aplicadas.

Las TB estudiadas se clasificaron en base a distintas variables definidas en documentos conceso utilizados. Así, se analizó cada caso de TB confirmada incluida en el estudio en los parámetros: baciloscopia, cultivos y/ o detección molecular, localización de la TB, tipo de resistencias con posible brote de las mismas y país de origen (caso importado). Entre las variables definidas no se incluyeron los datos de tratamientos previos y seguimiento hasta el final del caso.

a) Criterios diagnósticos de laboratorio:

- *Caso confirmado bacteriológicamente (TB confirmada)*: aquel caso que presenta criterios diagnósticos de laboratorio, (aislamiento en cultivo de un microorganismo del complejo *M. tuberculosis*). Este criterio ha sido el utilizado en este trabajo para la inclusión de casos.
- *Caso no confirmado bacteriológicamente*: aquel que, sin tener criterios diagnósticos de laboratorio, cumpla los criterios de definición clínica de caso.

b) Según los antecedentes de tratamiento previo:

- *Caso nuevo*: paciente que nunca ha recibido tratamiento antituberculoso o bien lo ha recibido durante un periodo de tiempo inferior a un mes.
- *Caso tratado previamente*: paciente que ha recibido tratamiento antituberculoso (excluyendo quimioprofilaxis) al menos durante un mes. Estos casos incluirían las recidivas, los tratamientos tras abandono, los fallos terapéuticos y otros como los casos crónicos.

Estas definiciones, según tratamiento previo, no pudieron ser valoradas como variables en este estudio, al no disponer de forma clara de los datos necesarios para su clasificación.

c) Según a efectos de su declaración:

- *Caso Sospecha*: declaración inicial que luego no consigue los criterios clínicos/laboratorio de TB.
- *Caso Probable*: TB que cumple criterios clínicos y/ o de laboratorio, pero no confirmado.
- *Caso Confirmado*: TB con aislamiento y/ o detección de *M. tuberculosis complex* según criterios de laboratorio

d) Según su infecciosidad:

Cada caso en especial los de TB pulmonar, se clasifican según sean o no bacilíferos, en este caso son detección BAAR tras tinción en microscopia directa de la muestra. La baciloscopia positiva de muestra pulmonar y su grado de positividad se asocia a la capacidad de transmisión del microorganismo.

e) Según la localización de la enfermedad:

- *Tuberculosis pulmonar (TBP)*: TB que afecta al parénquima pulmonar y al árbol traqueobronquial, incluyendo además la tuberculosis laríngea. En los casos con TB que afecte distintas localizaciones, la pulmonar se considerará siempre como foco primario, siendo el resto adicionales (foco secundario).

- *Tuberculosis extrapulmonar (TBEP)*: TB que afecta a cualquier otra localización no pulmonar, incluyendo la tuberculosis pleural y la linfática intratorácica cuando no haya afectación del parénquima pulmonar. Las distintas formas de TBEP se clasifican en:
 - *Tuberculosis pleural*: la que afecta exclusivamente a la pleura, con o sin derrame pleural.
 - *Tuberculosis linfática*: la que afecta al sistema linfático. Se distinguen las formas intratorácica y extratorácica según la localización de los ganglios afectados.
 - *Tuberculosis ósteoarticular*: la que afecta a huesos y articulaciones. Se distingue entre localización vertebral y no vertebral.
 - *Tuberculosis genitourinaria*: la que afecta al aparato genital y/ o urinario.
 - *Tuberculosis del Sistema Nervioso Central*: la que afecta a médula y todo el SNC.
 - *Tuberculosis digestiva/ peritoneal*: la que afecta al peritoneo (con o sin ascitis) y al aparato digestivo en cualquier localización.
 - *Tuberculosis diseminada*: la que afecta a más de dos aparatos y/ o en caso de tuberculosis miliar se clasifica como tuberculosis diseminada en caso de aislamiento de *M. tuberculosis* complex en sangre. En los casos con más de un órgano afectado si una de las localizaciones es el pulmón, se notificará con ambas localizaciones: pulmonar y diseminada. La tuberculosis miliar se clasificará, por tanto, como pulmonar y diseminada.

f) Estudios de sensibilidad a tuberculostáticos:

Las definiciones generales de resistencia que se utilizan en TB diferencian teóricamente entre:

- *TB con resistencia primaria*: resistencia detectada a cualquiera de los fármacos antituberculosos de primera línea en pacientes nunca tratados.
- *TB con resistencia secundaria o adquirida*: resistencia detectada en pacientes que han sido tratados previamente, durante al menos un mes con fármacos antituberculosos, excluida la quimioterapia preventiva.

Estos casos de resistencia se clasifican además según los fármacos a los que la cepa presente resistencia:

- *Tuberculosis resistente*: cuando la cepa de *M. tuberculosis* es resistente a cualquiera de los fármacos antituberculosos de primera línea [estreptomicina (S), isoniacida (H), rifampicina (R), etambutol (E) o pirazinamida (Z)].
- *Tuberculosis multirresistente (MDR-TB)*: cuando la cepa es resistente, dentro de las de primera línea, al menos a isoniacida y rifampicina.
- *Tuberculosis pre- extremadamente resistente (pre XDR-TB)*: causado por cepa MDR-TB y además con resistencia, bien a una fluoroquinolona o a un fármaco inyectable de segunda línea (amikacina, capreomicina o kanamicina).
- *Tuberculosis extremadamente resistente (XDR-TB)*: caso de tuberculosis causado por una cepa MDR- TB con resistencia, además, tanto a una fluoroquinolona como a un fármaco inyectable de segunda línea (amikacina, capreomicina o kanamicina).

En este trabajo se analizaron las resistencias a los fármacos antituberculosos de primera línea (estreptomicina, isoniacida, rifampicina, etambutol y/ o pirazinamida) así como a las posibles alternativas (fluoroquinolonas y fármacos inyectables). Se estudió la posible presencia de cepas multirresistentes (MDR-TB), cepas pre- extremadamente (pre XDR-TB) y extremadamente resistentes (XDR-TB).

g) Según su origen: casos autóctonos/ importados:

La TB importada incluye aquellos casos en pacientes inmigrantes diagnosticados en España dentro de sus cuatro primeros meses de residencia. Al limitar a este periodo de estancia se diferencia entre: i) *casos importados* que con toda probabilidad han desarrollado la enfermedad en su país de origen; y ii) *resto de casos de TB* en donde, aunque se produzca en población extranjera no se puede descartar que su transmisión se haya producido desde casos autóctonos de España.

En este estudio solo se pudo diferenciar, por falta de datos de fecha de inmigración, entre los casos de pacientes con nacionalidad española (autóctonos) y casos extranjeros, sin aplicar el criterio “tiempo de residencia en este país” por lo que no se pudo definir esta variable como “caso importado”.

h) Evolución del caso TB y finalización del tratamiento:

Según las normas elaboradas para la evaluación estandarizada de los programas de control en los países de la Región Europea el seguimiento de los resultados al finalizar el tratamiento de una TB se basa en siete categorías con definiciones estandarizadas y mutuamente excluyentes:

- *Curación:* paciente que ha completado el tratamiento y presenta negativización de las pruebas microbiológicas en muestras tomadas durante y al final del tratamiento.
- *Tratamiento completo:* paciente que ha completado el tratamiento y no cumple criterios para ser clasificado como curación o fracaso terapéutico.
- *Fracaso terapéutico:* paciente que cinco meses después de iniciado el tratamiento, y habiéndolo realizado correctamente, no ha alcanzado la conversión bacteriológica, o que, habiéndola realizado, presenta una reversión de ésta, y al que es preciso cambiar el tratamiento de primera línea por tratamiento de segunda línea.
- *Traslado:* paciente que se ha mudado de residencia y por ello ha sido transferido a otro sistema de registro, y cuyos resultados terapéuticos son desconocidos.
- *Abandono:* paciente que ha interrumpido el tratamiento durante dos o más meses, sin que se deba a una decisión facultativa; o bien, paciente perdido en el seguimiento antes de que haya finalizado su tratamiento.
- *Muerte:* paciente que ha fallecido por cualquier causa durante el tratamiento.
- *Otro, no evaluado:* paciente que continúa en tratamiento a los 12 meses de haberlo iniciado y que cumple cualquiera de las siguientes condiciones: i) tratamiento prolongado como consecuencia de efectos secundarios/complicaciones; ii) tratamiento inicial planificado con una duración mayor de 12 meses; y iii) no hay información sobre las causas que han motivado que el paciente se encuentre todavía en tratamiento.

Estas variables no se aplicaron en el presente estudio.

i) Definición de brote:

Se define como: i) *Brote TB*, con aparición de 1 o más casos, a partir de un mismo caso índice en un periodo de 1 año desde que se diagnosticó el primer caso; y ii) *Brote de TB confirmado por estudios moleculares*, con aparición de uno o más casos con vínculo epidemiológico, a partir de un mismo caso índice y en un periodo de 1 año desde que se diagnosticó el primer caso y en cuyos aislamientos se obtienen, tras estudios de caracterización molecular genotipos idénticos o fuertemente relacionados.

En el estudio se aplicaron métodos moleculares para detección de brotes confirmados por estudios moleculares exclusivamente a los casos con posibles multirresistencias, por las implicaciones epidemiológicas que estas pudieran causar en el área.

3.3.- Datos oficiales de TB declaradas.

Se recopilaron los datos oficiales publicados en el Boletín Epidemiológico Semanal, para conocer la situación de la tuberculosis en España. Son los datos procedentes de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE), pudiendo así analizar y comparar la evolución de la TB según estos datos y los obtenidos en el trabajo^(19,20,22).

Se tomaron los datos de incidencia por años en España, Comunidad Valenciana y Departamentos de Salud a partir de los documentos oficiales en los Informes de Salud de la Conselleria de Sanitat ^(17,27-31). Se incluyeron además los datos, allí recogidos en su caso, de variables como VIH positivo, inmigración, demora diagnóstica y resistencias.

3.4.- Diagnóstico y confirmación microbiológica de *M. tuberculosis complex*.

El diagnóstico microbiológico de caso de TB confirmado se realizó, a lo largo de los años del estudio, a partir de las pautas de rutina aplicadas en la sección de

micobacterias del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Dr. Peset. Partiendo de estos datos iniciales, se realizaron las intervenciones necesarias sobre este estudio retrospectivo, bien revisando los datos en las Historias Clínicas o confirmando o realizando, a partir de las cepas de *M. tuberculosis* complex, mantenidas mediante congelación a -20°C, las pruebas microbiológicas necesarias.

En estos apartados se resumen las pautas utilizadas en rutina para el diagnóstico en cada momento del caso y las posibles intervenciones sobre cepas en especial al aplicar métodos de estudio y confirmación de resistencias.

3.4.1.- Procesamiento de muestras.

Se procesaron en el Servicio de Microbiología aquellas muestras remitidas a lo largo de 2005- 2015 desde los distintos puntos de atención a los pacientes con sospecha de enfermedad por micobacterias (urgencias del hospital, consultas externas, salas de hospitalización, centro de especialidades y/ o centros de atención primaria). Estas se remitieron, correctamente identificadas con los volantes de petición de estudio microbiológico para investigación de micobacterias al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Dr. Peset, donde está centralizado el diagnóstico microbiológico de todo el Departamento de Salud Valencia- Dr. Peset.

Tras su recepción las muestras se procesaron en la Sección de Micobacterias del Servicio, siguiendo el protocolo establecido para ello: i) descontaminación-homogenización de muestra; ii) tinción para detección de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR); iii) detección en su caso de ADN por PCR en tiempo real; iv) cultivo en Löwenstein- Jensen (LJ) y en medio líquido mediante sistema automatizado BACTEC MGIT 960® (BD)- o BacT/ Alert MB® (BioMérieux) para muestras de sangre o médula ósea; v) identificación fenotípica de especie; y vi) estudio de sensibilidad por métodos fenotípicos para tuberculostáticos de primera línea mediante sistema automatizado en medio líquido (SIRE- P BACTEC MGIT 960® (BD)), por métodos genotípicos convencionales con detección molecular de mutaciones que codifiquen resistencias a isoniacida (H), rifampicina (R), etambutol (E), flruoroquinolonas (FQ),

aminoglucósidos (kanamicina, amikacina, capreomicina) y por último, en algunas cepas seleccionadas por su interés clínico y microbiológico, secuenciación del genoma para detección/ confirmación de las resistencias.

3.4.2.- Tipos de muestras.

Las muestras procesadas ante sospecha de TB pulmonar y/ o pleural fueron:

- *Espuito*: su recogida se realiza en recipientes de plástico esterilizados de boca ancha o en su caso *espuito inducido* (cuando el enfermo no consigue expectorar correctamente aplicando aerosoles de suero fisiológico durante 15- 30 minutos).
- *Aspirado traqueal*
- *Broncoaspirado (BAS), Lavado broncoalveolar (BAL) o cepillado bronquial*: obtenidos tras broncoscopia y tratados igual que el espuito.
- *Lavado gástrico*: es necesario para los pacientes en que las técnicas de expectoración no dan resultado.
- *Líquido pleural, biopsia pleural o punciones de abscesos*.

En los casos con sospecha de TB extrapulmonar las muestras remitidas fueron:

- *Orina*: se recomienda recoger la orina de primera hora de la mañana de tres días consecutivos.
- *Heces*: se toma una pequeña porción de las heces que se mezcla con agua destilada estéril.
- *Biopsia de adenopatías o de otras localizaciones*: remitida para estudio microbiológico en frasco estéril, no formolado.
- *Sangre*: sangre periférica en frascos de hemocultivos específicos para micobacterias.
- *Líquido cefalorraquídeo (LCR)*: se obtiene por punción lumbar, siguiendo las mismas normas de recogida y transporte que para los otros estudios microbiológicos.
- *Líquido sinovial, articular u otros líquidos biológicos*: se utiliza el mismo criterio que con el LCR.
- *Piezas operatorias y otras muestras*: de las partes sospechosas de la pieza se toma un fragmento que se macera previo procesamiento.

3.4.3.- Valoración microscópica de las muestras y baciloscopia.

A todas las muestras de esputo para estudio de micobacterias se les realizó una tinción de Gram (Tabla 3.2.a) para establecer los criterios de su “calidad” con el fin de clasificar el esputo atendiendo a los criterios del CDC (centro para el control y prevención de enfermedades) que se describen en la (Tabla 3.2.b). La baciloscopia se realizó a todas las muestras mediante tinción de Ziehl- Neelsen para la detección de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) y su valoración semicuantitativa según la carga bacilar (Tabla 3.3.a y 3.3.b).

Tabla 3.2.- Procedimiento y valoración microscópica del esputo.

a) Procedimiento de la Tinción de Gram.

Reactivos
Cristal de violeta QCA®
Iodo PVP (Lugol) QCA®
Decolorante Gram (alcohol acetona) QCA®
Safranina QCA®
Técnica
- Fijar la extensión de la muestra a la llama sobre portaobjetos
- Cubrir con cristal de violeta 1 minuto
- Lavar con agua
- Añadir lugol/ 1 minuto
- Lavar y decolorar con alcohol- acetona (70/ 30)/ 15 segundos
- Lavar con agua
- Cubrir con safranina/ 2 minutos
- Lavar con agua, secar al aire y observar al MO con objetivo 100X

b) Criterios del CDC para la valoración del Gram en esputo (grupos G1- G6) expresada en nº de células por campo con objetivo 10X ⁽¹²⁴⁾.

Grupo	Leucocitos	Células epiteliales	Cultivo para micobacterias
G1	<25	>25	No procede *
G2	10- 25	>25	No procede *
G3	>25	>25	Procede
G4	>25	10- 25	Procede
G5	>25	<10	Procede
G6	<25	<25	Procede

*se recomienda remitir nueva muestra de mayor calidad, aunque sí se procede a cultivo en caso de ser baciloscopia positiva para BAAR.

Tabla 3.3.- Observación de BAAR al microscopio y criterio de interpretación.

a) Procedimiento de la Tinción de Ziehl- Neelsen.

Reactivos
Fucsina fenicada QCA®
Azul Metileno QCA®
Alcohol clorhídrico PANREAC®
Alcohol de 96°
Técnica
- Fijar la extensión de la muestra sobre portaobjetos a la llama
- Cubrir con fucsina fenicada y calentar con llama la preparación hasta que emita vapores (calentar 3- 4 veces durante 10 minutos añadiendo colorante para evitar que se seque)
- Lavar con agua y decolorar con alcohol clorhídrico (97/ 3)/ 2- 3 minutos
- Lavar con agua y cubrir con azul de metileno/ 5 minutos
- Lavar con agua, secar y observar al MO con objetivo de inmersión 100X

b) Criterios de valoración ⁽⁶⁾.

Informe	n° BAAR (1000X)
Negativo	No se observa BAAR/ 100 campos
Dudoso (repetir)	1 a 2/ 300 campos (3 barridos)
BAAR +	De 1 a 9 BAAR/ 100 campos (1 barrido)
BAAR ++	De 1 a 9 BAAR/ 10 campos
BAAR +++	De 1 a 9 BAAR/ campo
BAAR ++++	> De 9 BAAR/ campo

3.4.4.- Procedimientos para descontaminación y siembra de las muestras.

El procesamiento de la muestra fue distinto según sus características:

- *Las muestras no estériles* (esputo, aspirado traqueal, BAS, BAL, orina, heces o líquidos con posible flora acompañante) se descontaminaron y fluidificaron con N-acetil-L-cisteína-hidróxido sódico (NALC- NaOH) mediante la solución BD BBL MycoPrep®, es el método que se recomienda como agente digestivo y descontaminante para la siembra en medio líquido de MGIT (BD) (Tabla 3.4).

Tabla 3.4.- Método de descontaminación mediante la técnica BD BBL MycoPrep®.

Descontaminación
- Transferir 10ml de la solución NALC- NaOH activada en los tubos nuck. - Añadir igual volumen (10ml) de la muestra en cada tubo nuck. - Si no disponemos de 10 ml de muestra añadir esputasol en las muestras respiratorias y agua estéril en el resto de muestras. Si el volumen de la muestra excediera de 10ml, centrifugar para concentrarla y resuspender el sedimento con agua estéril - Cerrar el tubo y agitar.
Neutralización/ Centrifugación
- Enrasar el tubo Nuck hasta 50 ml con agua destilada estéril. - Mezclar y centrifugar a 3000 rpm durante 20 minutos. - Decantar con cuidado todo el fluido sobrenadante en un contenedor para líquidos con peligro biológico. - Utilizar la suspensión para la inoculación de medios de cultivo.

- *Las muestras inicialmente estériles* (LCR, líquido ascítico, sinovial, pleural, etc....) se sembraron de forma directa sin tratamiento previo, siempre que se confirmara tras tinción de Gram la presencia de otro tipo de flora.
- *Las muestras sólidas* (biopsias de tejidos o piezas operatorias de zonas estériles) se emulsionaron en agua destilada estéril y se maceraron para su homogeneización, antes de su siembra.

La siembra de las muestras se realizó siguiendo la rutina del laboratorio en dos tipos de medios:

1. *Siembra en medio sólido de Löwenstein- Jensen (LJ):* LJ con piruvato (BioMérieux®). Tras descontaminación, homogenización y neutralización la muestra se sembró en la pendiente del medio de cultivo para su incubación durante 8 semanas a 37°C. En el caso de biopsias de piel o sospecha de MNT se incubaron a 30°C y/ o 42°C según requerimiento del posible microorganismo. La lectura de todos los tubos se llevó a cabo semanalmente para la detección de crecimiento. El informe final como muestra negativa se completó a los 60 días.
2. *Siembra en medios líquidos:* siguiendo la pauta del laboratorio estas muestras, tanto pulmonares como extrapulmonares (excepto sangre) se procesaron para el aislamiento primario en medio líquido para disminuir el tiempo de crecimiento, las *muestras “no sangre”* también se sembraron en medio líquido en tubo BBL

MGIT BD[®]; se incubaron en el sistema automatizado BACTEC MGIT 960[®]. Para las *muestras de sangre o médula ósea* se utilizaron frascos específicos de hemocultivos del sistema automatizado BacT/ Alert MB (BioMérieux[®]). En ambos sistemas se incubaron los frascos durante 42 días o hasta su positividad. (Figura 3.1).

Figura 3.1.- Sistemas automatizados BACTEC MGIT 960[®] (BD) y BacT/ Alert MB[®] (BioMérieux) para micobacterias.

a) Sistema BACTEC MGIT 960[®]



b) Sistema BacT/ Alert MB[®]



3.4.5.- Pauta de identificación feno- genotípica de especie micobacteriana.

A partir de los cultivos positivos o incluso de muestra directa, se procedió mediante métodos convencionales (basados en características de crecimiento y pruebas bioquímicas) o métodos basados en técnicas moleculares a la identificación de especie, confirmando en su caso la presencia o no de MTB en la muestra del paciente.

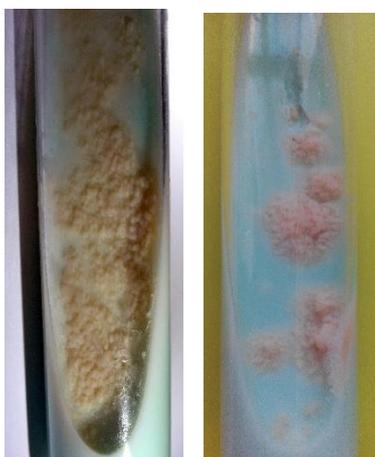
3.4.5.1.- Identificación por métodos convencionales.

3.4.5.1.1.- Características físicas y bioquímicas del crecimiento en LJ.

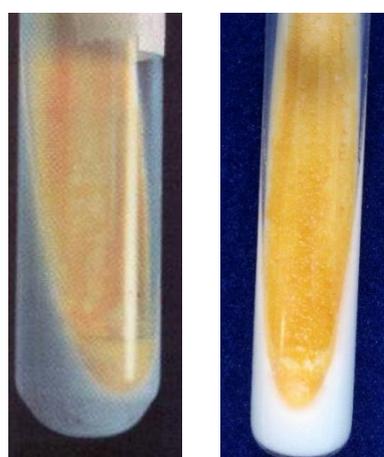
La identificación de especie en micobacterias se ha basado hasta hace no muchos años en la observación de las características físicas del crecimiento en LJ. Se pueden distinguir dos tipos de colonias: i) rugosas (R, Rough), secas, que se diluyen mal en el agua dando suspensiones grumosas; y ii) colonias con aspecto liso, húmedo (S, Smooth) (Figura 3.2). La aplicación de pruebas de estudio bioquímico, como son la prueba de la niacina, la catalasa y la reducción de nitratos sobre estas colonias ayuda en la diferenciación de distintas especies. Todas las micobacterias aisladas en humanos son mesófilas y crecen a 37°C, aunque algunas micobacterias no tuberculosas pueden ser termófilas (42°C) como son *M. avium*, *M. xenopi*, etc.... o necesitar una temperatura entre 25- 30°C como *M. marinum*, *M. ulcerans*, etc...

Figura 3.2.- Ejemplos de aspecto físico de crecimiento en LJ de distintas especies de micobacterias.

a) LJ con *M. tuberculosis* complex
(colonias rugosas no pigmentadas)



b) LJ con MNT
(colonias rugosas pigmentadas)



a) Velocidad de crecimiento y/ o producción de pigmento de colonias en LJ.

Basándose en la velocidad de crecimiento, la morfología y la capacidad de pigmentación de las colonias en medios sólidos (características físicas) las micobacterias se han clasificado fenotípicamente (Runyon, 1959) ⁽⁴⁷⁾, en cuatro clásicos

grupos, tres grupos de crecimiento lento (más de 14 días) y un cuarto grupo de crecimiento rápido (antes de los 7 días), descrito en la tabla 3.5.

- *Grupo I:* Micobacterias de crecimiento lento y fotocromógenas: formación de pigmento amarillo cuando se exponen a la luz.
- *Grupo II:* Micobacterias de crecimiento lento y escotocromógenas: formación de pigmento incluso en ausencia de luz.
- *Grupo III:* Micobacterias de crecimiento lento y no cromógenas (no producen pigmento), aunque algunas de ellas sí pueden producir una ligera pigmentación.
- *Grupo IV:* Micobacterias de crecimiento rápido con/ sin pigmentación que crecen en LJ antes de los 7 días de incubación a 25- 37°C.

Tabla 3.5.- Clasificación de Runyon. Micobacterias aisladas en muestras clínicas ⁽²⁾.

Micobacterias de crecimiento lento			MNT de crecimiento rápido
Grupo I Fotocromógenas	Grupo II Escotocromógenas	Grupo III No cromógenas	Grupo IV No cromógenas
<i>M. asiaticum</i>	<i>M. flavescens</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. abscessus</i>
<i>M. kansasii</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. chelonae</i>
<i>M. marinum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. simiae</i>	<i>M. szulgai</i>	<i>M. gastri</i>	<i>M. mucogenicum</i>
	<i>M. xenopi</i>	<i>M. genavense</i>	<i>M. peregrinum</i>
		<i>M. haemophilum</i>	<i>M. porcinum</i>
		<i>M. intracellulare</i>	
		<i>M. malmoense</i>	
		<i>M. nonchromogenicum</i>	
		<i>M. shimoidei</i>	
		<i>M. terrae</i>	
		<i>M. triviale</i>	
		<i>M. tuberculosis</i>	
		<i>M. ulcerans</i>	

b) Pruebas bioquímicas de identificación de *Mycobacterium* spp.

El estudio de las distintas características bioquímicas a partir de masa bacteriana suficientemente crecida en medio LJ se sigue utilizando, aunque con menor frecuencia en la actualidad, para diferenciación de *M. tuberculosis* complex vs. el resto de MNT. A pesar de la implantación de métodos más rápidos y específicos basados en técnicas moleculares, el tema de costes y/ o disponibilidad hace que en ocasiones se sigan aplicando algunas de estas pruebas bioquímicas al menos en el diagnóstico de rutina de MTB:

- i) *Prueba de la niacina*: una reacción positiva se traduce al utilizar anilina por la aparición inmediata de un color amarillo intenso, en el caso de *M. tuberculosis* por producción de ácido isonicotínico;
- ii) *Prueba de la catalasa*: si bien las micobacterias dan la prueba de la catalasa positiva a 22°C, resulta diferencial el que *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. africanum* no produzcan catalasa a 68°C (poseen catalasa termosensible);
- iii) *Prueba de la reducción de nitratos*: la producción de nitratos a partir de nitritos se traduce en la aparición de color rosa- rojo en la reacción. Esta reacción es positiva en *M. tuberculosis* y otras MNT (*M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. fortuitum*, etc...), débilmente positiva en *M. africanum* o *M. scrofulaceum*, mientras que es negativa en *M. bovis* y otras MNT (*M. marinum*, *M. xenopi*, *M. chelonae*, etc...).

3.4.5.1.2.- Identificación por métodos rápidos moleculares y de detección antigénica.

La necesidad e interés en el desarrollo de métodos rápidos de diagnóstico en micobacterias se basa en que es mucho más eficaz para conseguir un mejor control y manejo precoz de la TB. Por ello, en los últimos años se han incorporado distintos métodos de diagnóstico rápido de micobacterias por técnicas moleculares de amplificación- PCR o por detección inmunocromatográfica de Ag específicos de TB.

1.- Técnica de hibridación con sondas de ADN específicas.

Durante los primeros años de este estudio, hasta finales del año 2009, en la pauta del Servicio de Microbiología la identificación de especie de micobacteria se realizó mediante la técnica de hibridación con sondas de ADN específicas. El sistema utilizado fue el de sondas génicas comercialmente disponibles (AccuProbe- Gen-Probe®- BioMérieux) preparadas en kits comerciales. La limitación de este sistema es la necesidad de utilizar sondas diferentes para cada especie (*M. tuberculosis* complex, *M. kansasii* o *M. avium* complex) así como el problema de disponibilidad de sondas para prácticamente sólo las especies referidas y no para el resto de MNT. La ventaja respecto

a los métodos convencionales fue el poder identificar la especie bacteriana en prácticamente dos horas a partir de la masa directamente, permitiendo disminuir el tiempo en la identificación definitiva de especie.

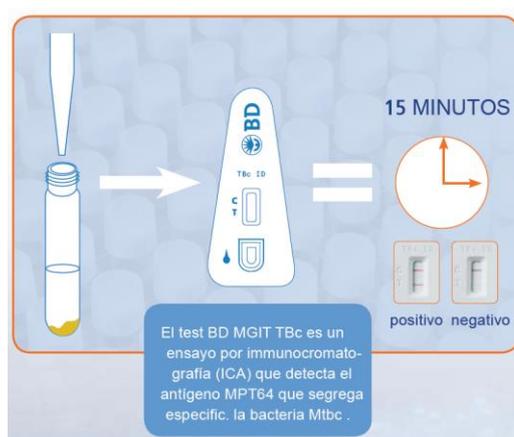
2.- Técnica de inmunocromatografía para detección de antígeno.

A partir del año 2010 hasta la fecha, por la facilidad de uso, tiempo a invertir y costes, se utiliza para identificación de MTB en la rutina del Servicio de Microbiología un sistema comercializado y rápido de inmunoanálisis cromatográfico (BD MGIT Tbc Identification Test®).

2.a.- Fundamento y utilidad de la prueba.

Es una técnica rápida en sistema bañera para la detección cualitativa de antígeno secretado MPT64 del complejo MTB a partir del crecimiento en medios líquidos de MGIT tras observación de BAAR en el mismo. Se trata de un sencillo inmunoanálisis cromatográfico que no requiere preparación alguna de las muestras y un tiempo total de análisis de 15 minutos. La reactividad se determina mediante reacción colorimétrica sobre membrana detectando *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*, siendo así capaz de identificar MTB desde cultivos de forma rápida y eficaz. (Figura 3.3).

Figura 3.3.- Metodología e interpretación de prueba IC para detección de Ag MPT64.



*Tomada de: BD MGIT Tbc Identification Test®

2.b.- Principios de la técnica.

Esta técnica se basa en la detección de Ag secretado MPT64, una fracción de proteína micobacteriana que producen las células del complejo MTB durante el crecimiento en cultivo. Una vez que las muestra se añaden el dispositivo de análisis, los antígenos MPT64 se unen a los anticuerpos específicos de MPT64 conjugados con partículas de visualización en la tira del análisis. El complejo antígeno- conjugado se desplaza por la tira de análisis hasta el área de reacción y es atrapado por un segundo anticuerpo específico de MPT64 aplicado a la membrana. Si el antígeno MPT64 está presente en la muestra, las partículas de oro coloidal marcadas producen una reacción de color que se manifiesta de forma visible en una línea de color entre rosa y rojo.

2.c.- Procedimiento de trabajo.

1. Colocar el dispositivo TBc ID en una superficie plana.
2. Rotular un dispositivo para cada muestra que se vaya a analizar.
3. Mezclar la muestra (tubo MGIT positivo con BAAR positivo) por inversión o en vórtex.
4. Pipetear con una punta estéril 100 µl de muestra y ponerlo en el pocillo de muestra correspondiente.
5. Transcurridos 15 minutos, leer y registrar el resultado. No interpretar el resultado pasados 60 minutos.

Cada dispositivo contiene controles de procedimiento interno positivo y negativo. La aparición de una línea de control en la ventana de lectura situada en la posición de control "C" proporciona un control positivo interno que valida el funcionamiento correcto del reactivo y garantiza que se ha seguido el procedimiento de análisis adecuado. El área de la membrana situada alrededor de las líneas de análisis y de control constituye el control interno negativo del dispositivo. Un área de fondo de color blanco a rosado claro indica que el análisis se está realizando correctamente.

2.d.- Interpretación de los resultados.

- *Análisis positivo para TBc (presencia de antígeno MPT64):* aparece una línea de color entre rosa y rojo en las posiciones "T" (análisis) y "C" (control) de la ventana de lectura. Esto indica que el análisis ha detectado antígeno MPT64 en la muestra. La intensidad de las líneas en las posiciones C y T puede variar. El

color del área de fondo debe ser entre blanco y rosado claro y debe notificarse como complejo MTB.

- *Análisis negativo para TB (no se detecta antígeno MPT64):* no aparece una línea de un color entre rosa y rojo en la posición “T” (análisis) de la ventana de lectura y debe notificarse como no complejo MTB.
- *Análisis no válido:* el análisis no es válido si no aparece una línea de un color entre rosa y rojo en la posición “C” (control) de la ventana de lectura o si el color del área de fondo impide la interpretación del análisis. En caso de que el resultado no sea válido, la muestra debe analizarse de nuevo con otro dispositivo. Un análisis no válido no se debe registrar en los resultados.

3.- Técnica de PCR- hibridación reversa para diferenciación del complejo *M. tuberculosis*.

La confirmación molecular de especie dentro del complejo *M. tuberculosis* se realizó mediante técnica de PCR- hibridación reversa. Se utilizó el sistema GenoType MTBC Ver 1.X HAIN LifeScience®, basado en tecnología ADN- STRIP que permite en base a los polimorfismos genéticos la diferenciación genética de las distintas especies que forman parte del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

3.a.- Fundamento y utilidad de la prueba.

Esta técnica permite diferenciar especies/ cepas pertenecientes al grupo *M. tuberculosis* complex: *M. tuberculosis*/ “*M. canetti*”. *M. africanum*, *M. bovis* BCG, *M. bovis* spp. *bovis*, *M. bovis* spp. *caprae* y *M. microti*.

3.b.- Principios de la técnica.

El procedimiento completo se divide en tres pasos: i) extracción de ADN procedente de cultivo (medio sólido/ medio líquido) o de muestra clínica directa; ii) amplificación multiplex con cebadores marcados con biotina; y iii) hibridación reversa.

Las tiras de membrana están recubiertas con sondas específicas complementarias a los ácidos nucleicos amplificados. Después de la desnaturalización, las cadenas simples de los amplicones se unen a las sondas (hibridación). La alta especificidad de unión de las sondas con el ADN complementario está asegurada por las condiciones astringentes resultantes de la combinación de la composición del tampón y la correcta temperatura. De este modo las sondas discriminan realmente las variaciones en la secuencia de las regiones de los genes estudiados. La fosfatasa alcalina conjugada con la estreptavidina se une a la biotina de los amplicones a través de la fracción de estreptavidina. Finalmente, la fosfatasa alcalina transforma el sustrato añadido en un colorante que resulta visible en la membrana en forma de precipitado de color. Una plantilla asegura la interpretación sencilla y rápida del perfil de bandas obtenido.

3.c.- Procedimiento de trabajo.

1.- *Extracción de ADN.*

Se puede utilizar como material de partida para la extracción de ADN muestras de esputo descontaminadas, baciloscopias negativas o positivas, así como micobacterias cultivadas en medio sólido o en medio líquido. Para la extracción de ADN de muestras clínicas descontaminadas o cultivos se utiliza el kit GenoLyse®:

- Cuando se utiliza crecimiento bacteriano a partir de medio sólido con un asa de siembra se recogen dos o tres colonias y se suspenden con 100µl de tampón de lisis (A- LYS).
- Cuando se utiliza crecimiento bacteriano a partir de medio líquido, se coge directamente 1ml. Centrifugar 15 minutos a 10.000 rpm. Desechar el sobrenadante y añadir al sedimento (pellet) 100µl de tampón de lisis (A- LYS).
- Vortear la muestra e incubarla durante 5 minutos a 95°C en baño de agua.
- Añadir a la muestra 100µl de tampón neutralizador (A- NB) y vortear.
- Centrifugar durante 5 minutos a 12.000 rpm y utilizar directamente 5µl del sobrenadante para la PCR.

2.- *Amplificación.*

Todos los reactivos necesarios para la amplificación, así como la polimerasa y los cebadores, están incluidos en las Mezclas de Amplificación A y B (AM- A y AM- B).

Se prepara para cada muestra: 10 µl AM- A, 35 µl AM- B, 5 µl de solución de ADN, con un volumen final de 50 µl por muestra.

El Perfil de amplificación para muestras clínicas y muestras de cultivo es:

15 minutos	95°C	1 ciclo
30 segundos	95°C	} 10 ciclos
2 minutos	58°C	
25 segundos	95°C	} 20 ciclos
40 segundos	53°C	
40 segundos	70°C	
8 minutos	70°C	1 ciclo

- Determinar el número de muestras a analizar y preparar el número de tubos que sean necesarios.
- Preparar una mix que contenga AM- A y AM- B y mezclar cuidadosa sin utilizar el vórtex. El mix se debe preparar para cada uso.
- Alicuotar el mix en volúmenes de 45 µl en tubos de PCR y añadir 5 µl de solución de ADN a cada alícuota.

3.- Hibridación manual utilizando un TwinCubator.

- Poner en marcha el TwinCubator.
- Precalentar las soluciones HYB y STR a 37- 45°C antes de usar.
- Calentar a temperatura ambiente los restantes reactivos, con la excepción del CON- C y el SUB- C.
- En un tubo diluir el Conjugado Concentrado (CON- C, naranja) y el Sustrato Concentrado (SUB- C, amarillo) 1:100 con sus tampones respectivos (CON- C con CON- D, SUB- C con SUB- D) en las cantidades necesarias. Para cada muestra añadir 10 µl de concentrado más 1 ml de los respectivos tampones.

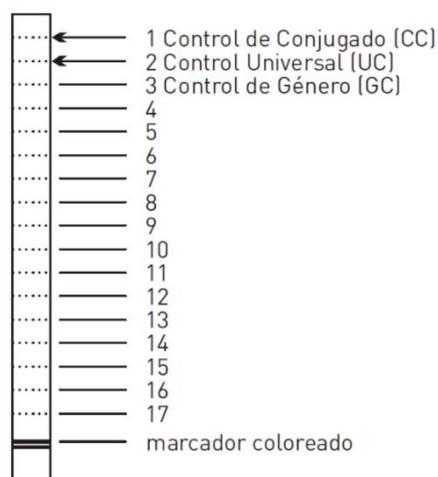
Procedimiento hibridación:

- Dispensar 20 µl de la Solución de Desnaturalización (DEN, azul).
- Añadir a la solución 20 µl de muestra amplificada, mezclar bien e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.

- Sacar las tiras de sus tubos usando pinzas e identifíquelas marcando bajo el marcador coloreado con un lápiz.
- Añadir a cada pocillo 1 ml de Tampón de Hibridación (HYB, verde) precalentado. Agitar suavemente la bandeja.
- Poner una tira en cada pocillo. Las tiras tienen que quedar completamente cubiertas por la solución y el lado con la sonda hacia arriba.
- Poner la bandeja en el TwinCubator durante 30 minutos a 45°C.
- Aspirar completamente el Tampón de Hibridación, con una pipeta Pasteur.
- Añadir 1 ml de Solución de Lavado Astringente (STR, roja) a cada tira e incubar durante 15 minutos a 45°C en el TwinCubator.
- Eliminar completamente la Solución de Lavado Astringente.
- Lavar con 1 ml de Solución de Aclarado (RIN) cada tira e incubar 1 minuto en el TwinCubator. Eliminar el RIN después de la incubación.
- Añadir 1 ml de Conjugado diluido a cada tira e incubar durante 30 minutos en el TwinCubator.
- Eliminar la solución y lavar cada tira dos veces durante 1 minuto con 1 ml de Solución de Aclarado (RIN) y de nuevo durante 1 minuto con 1 ml de agua destilada sobre el TwinCubator (desechar la solución cada vez).
- Añadir 1 ml de sustrato diluido a cada tira e incube sin agitación y protegiéndolas de la luz. El tiempo hasta que las bandas son claramente visibles, es aproximadamente de 20 minutos.
- Cuando las bandas sean claramente visibles, aclarar brevemente con agua destilada dos veces.
- Sacar las tiras de la bandeja con unas pinzas y secarlas entre dos capas de papel absorbente.

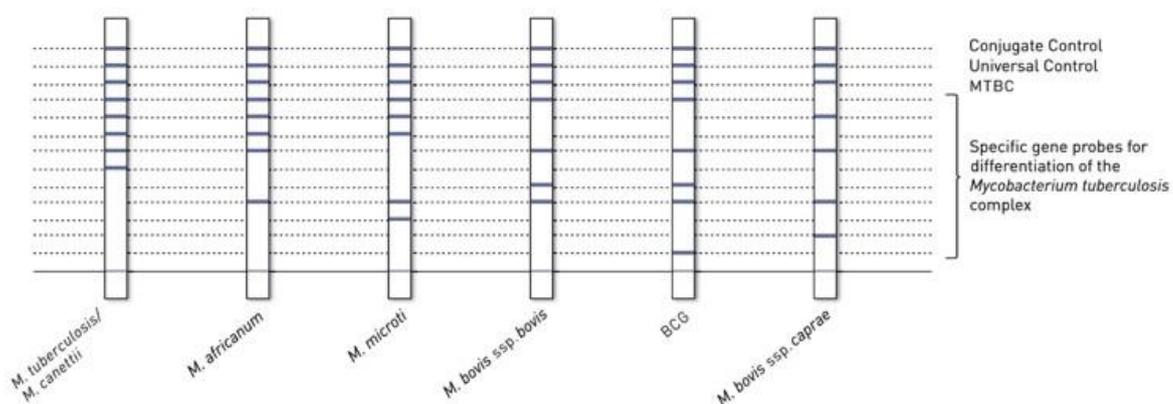
3.d.- Evaluación e interpretación de los resultados.

- Pegar las tiras reveladas en los campos marcados, alineando las bandas CC y UC con las respectivas líneas del formulario.
- Anotar el número de las bandas positivas en la penúltima columna y determinar la especie con la ayuda de la tabla de interpretación y registrar el nombre de las especies identificadas en la última columna.



- Control de conjugado (CC): debe aparecer una línea en esta zona, documentando la eficacia del conjugado unido y la reacción del sustrato.
- Control Universal (UC): esta zona detecta todas las micobacterias y miembros del grupo de bacterias gram positivas con alto contenido en G+C.
- MTBC: esta zona híbrida con amplicones generados de todos los miembros de *Mycobacterium tuberculosis* complex.
- Otras bandas: sondas específicas. No todas las bandas de una tira han de mostrar la misma intensidad, solamente han de considerarse aquellas bandas cuyas intensidades sean tan fuertes, o más fuertes que la intensidad del Control Universal.

Tabla de interpretación:



3.5.- Detección directa desde muestra de paciente de ADN de *M. tuberculosis* complex. PCR en tiempo real (GeneXpert MTB/ RIF Cepheid®).

El diagnóstico rápido de presencia de MTB en la muestra de un paciente con sospecha de TB como pauta para un abordaje precoz adecuado conlleva el no tener que manejarse con datos “preliminares” que tardarían en confirmarse con pautas convencionales, produciendo semanas de demora. En los últimos años se han desarrollado numerosos y distintos métodos con distintas técnicas de PCR “in house” y/ o comercializadas. Entre ellas en el Servicio de Microbiología del HU Dr. Peset, la PCR en tiempo real GeneXpert MTB/ RIF- Cepheid®, validada para muestras respiratorias, ha sido la utilizada para identificación de TB a partir de muestra directa. Esta metodología presenta la ventaja de que añade la detección simultánea molecular de resistencia a rifampicina.

a) Fundamento y utilidad de la prueba.

GeneXpert MTB/ RIF es una prueba diagnóstica “in vitro” de *nested*- PCR semicuantitativa y en tiempo real que se utiliza para amplificación de dos posibles dianas: i) la detección de compuestos de ADN de MTB en muestras de esputo positivas y/ o negativas para BAAR; y ii) la detección de mutaciones del gen *rpoB* asociadas a resistencia a rifampicina.

Esta detección molecular de MTB con sondas de amplificación de especie y de mutaciones en el gen *rpoB* asociadas a la resistencia a rifampicina acelera el diagnóstico de TB resistente a este fármaco, que se asocia habitualmente a cepas MDR-TB. Con la prueba GeneXpert MTB/ RIF esto puede conseguirse en menos de 3 horas a partir de muestras respiratorias del paciente.

En este estudio la prueba se utilizó para confirmación de especie y/ o detección de resistencia a rifampicina ante: i) baciloscopia positiva en paciente sin diagnóstico previo de TB; ii) casos con justificación clínica por elevada sospecha de TB y baciloscopia negativa; y iii) sospecha de posibilidad de estar ante un caso de MDR-TB.

b) Principio de la técnica.

El sistema GeneXpert automatiza e integra el procesamiento de muestras, la multiplicación del ácido nucleico y la detección de las secuencias diana mediante PCR y en tiempo real. Este sistema requiere el uso de cartuchos GeneXpert desechables de un solo uso para los reactivos y el proceso de PCR. Dado que los cartuchos son independientes, se elimina el riesgo de contaminación cruzada entre muestras.

El ensayo GeneXpert MTB/ RIF incluye reactivos para la detección de la tuberculosis y la resistencia a rifampicina, así como un control de procesamiento de muestra (SPC, *Sample Processing Control*) para controlar el adecuado procesamiento de las bacterias diana y para supervisar la presencia de inhibidores en la PCR. Mediante la función de comprobación de sonda (PCC, *Probe Check Control*), se comprueba la rehidratación de los reactivos, el llenado del tubo de PCR en el cartucho, la integridad de la sonda y la estabilidad del fluorocromo.

Los cebadores del ensayo GeneXpert MTB/ RIF amplifican una porción del gen *rpoB* que contiene la región central de 81 pares de bases. Las sondas son capaces de distinguir entre la secuencia salvaje conservada y las mutaciones de la región central que se asocian a la resistencia a rifampicina.

c) Procedimiento de trabajo.**▪ *Preparación del cartucho:***

Iniciar la prueba en un plazo de 30 minutos después de añadir la muestra al cartucho.

- Aspirar con una pipeta estéril la muestra licuada.
- Abrir la tapa del cartucho. Transferir la muestra al interior del cartucho GeneXpert MTB/ RIF por el orificio abierto y a continuación verterla lentamente.
- Cerrar la tapa del cartucho.

▪ *Procedimiento a seguir:*

- Encender el equipo y el instrumento GeneXpert Dx.
- En la ventana del sistema GeneXpert Dx, hacer clic en crear prueba. Aparece el cuadro de diálogo para escanear el código de barras de cartucho.

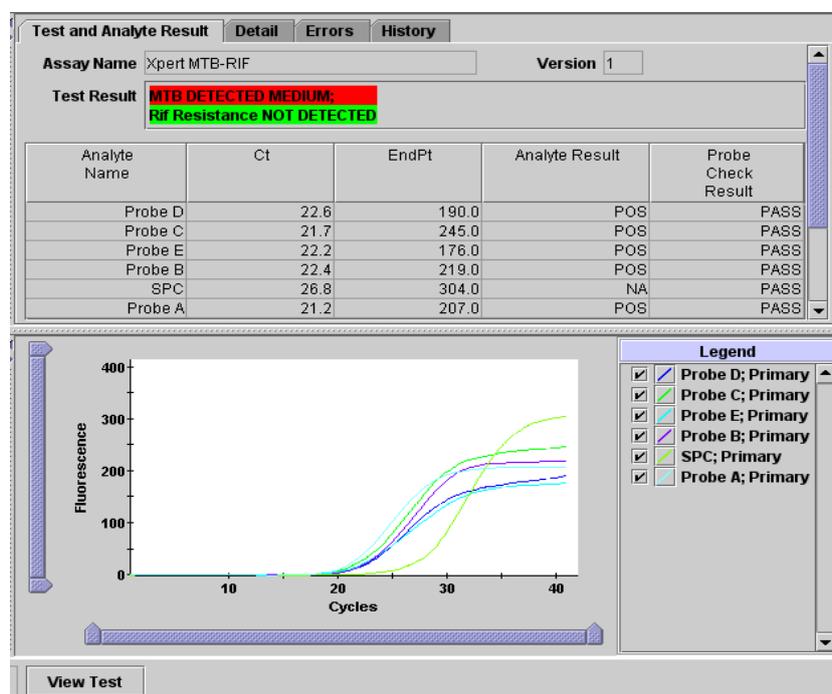
- Escanear el código de barras del cartucho GeneXpert MTB/ RIF. Aparece la ventana crear prueba. Utilizando la información del código de barras, el software rellenará automáticamente los cuadros de los siguientes campos:
- En el cuadro Id. de muestra, escanear el Id. de muestra.
- Hacer clic en Iniciar prueba.
- Abrir la puerta del modulo del instrumento mientras la luz este parpadeando en verde y cargue el cartucho.
- Cerrar la puerta. La prueba se inicia y la luz verde deja de parpadear. Una vez finalizada la prueba, la luz se apaga.
- Esperar hasta que el sistema desbloquee el cierre de la puerta al final de la prueba y, entonces, abrir la puerta del modulo y sacar el cartucho.
- Desechar los cartuchos usados en los contenedores de residuos de muestras.

d) Interpretación de los resultados.

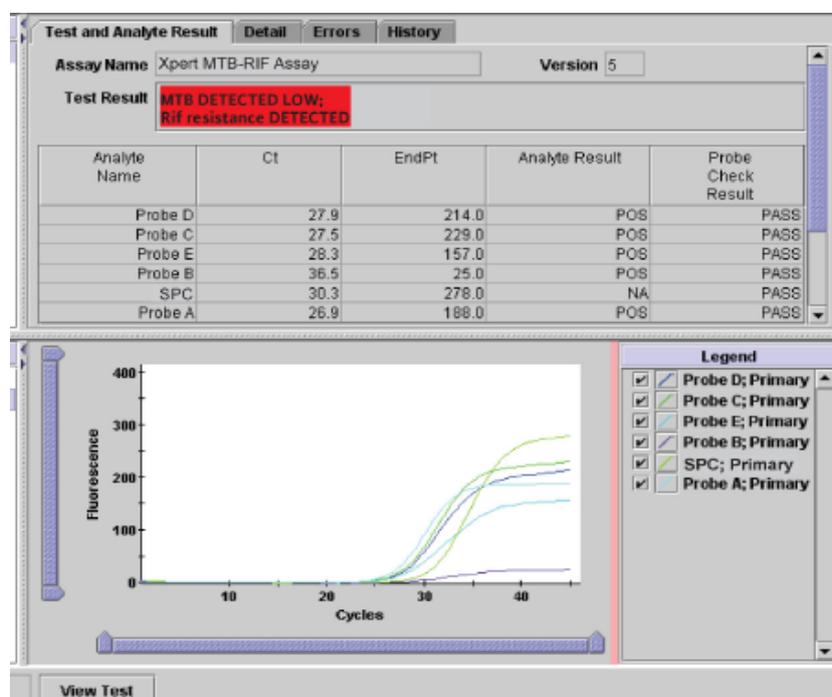
Antes de iniciar la PCR, el sistema GeneXpert mide la señal de fluorescencia de las sondas para controlar la rehidratación de las perlas, el llenado del tubo de reacción, la integridad de las sondas y la estabilidad del fluorocromo. La comprobación de sondas es correcta si cumple los criterios de aceptación asignados.

El GeneXpert interpreta los resultados a partir de las señales de fluorescencia medidas y de los algoritmos de cálculo integrados. Además, presenta la ventaja de emitir un resultado semicuantitativo. Interpreta la amplificación de fragmento *rpoB* como resistencia a rifampicina detectada o no detectada, identificando los casos positivos para TB y semicuantificando los resultados que se mostraran como alto, medio, bajo o muy bajo, dependiendo del valor de Ct del MTB diana siendo de <16, 16- 22, 22- 28 y >28 respectivamente. Los valores más bajos de Ct representan una concentración más alta de ADN amplificado y valores más altos de Ct representan una concentración más baja (Figura 3.4).

Figura 3.4.- Captura de imagen de pantalla en ejemplos de gráfica de amplificaciones, valores e interpretaciones de PCR en tiempo real sistema GeneXpert MTB/ RIF (Cepheid®).



Ventana de visualización de resultados: MTB detectado medio, resistencia a rifampicina no detectada



Ventana de visualización de resultados: MTB detectado bajo, resistencia a rifampicina detectada.

3.6.- Estudio de sensibilidad a tuberculostáticos.

Se estudió a lo largo del periodo analizado, la sensibilidad frente a tuberculostáticos de primera línea de los aislamientos de todos los casos de TB confirmados, tanto de las cepas de MTB obtenidas de primera muestra positiva procesada, como de positivos de muestras posteriores de control de posible fallo terapéutico. La detección de resistencias se realizó en todos los casos mediante métodos fenotípicos en sistema automatizado BACTEC MGIT 960[®] a partir de masa de crecimiento o de muestra directa BAAR con positividad elevada.

En el caso de detección de resistencias, el estudio se completó por métodos genotípicos convencionales mediante PCR- hibridación reversa (HAIN- LifeScience[®]) a partir de muestra directa y/ o posterior cultivo para detección de mutaciones en *rpoB*, *katG* e *inhA* para el estudio de resistencias a isoniacida y rifampicina (GenoType MTBDR_{plus}), detección de mutaciones en los genes *gyrA*, *rrs* y *embB* dando resistencias a fluoroquinolonas, aminoglicósidos/ ciclos peptídicos y etambutol respectivamente (GenoType MTBDR_{s/} V.1.0) y detección de mutaciones en los genes *gyrA*, *gyrB*, *rrs* y *eis* para el estudio de resistencias a fluoroquinolonas, aminoglicósidos/ péptidos cíclicos y kanamicina de bajo nivel respectivamente (GenoType MTBDR_{s/} V.2.0).

Los resultados se analizaron tanto por resistencia a cada fármaco, a grupos de fármacos y/ o por presencia de cepas MDR-TB o XDR-TB.

3.6.1.- Microbiograma para *Mycobacterium tuberculosis* complex. Método automatizado BACTEC- MGIT 960[®].

El clásico sistema de las proporciones de Canetti (1963) ⁽⁷⁰⁾ fue sustituido en el Servicio de Microbiología por un sistema ampliamente utilizado y validado que detecta resistencia a los fármacos de primera línea estreptomycin, isoniacida, rifampicina, etambutol y pirazinamida (SIRE- P) en tubo de BBL MGIT con cada antibiótico a la

concentración adecuada e interpretación automatizada de resistencias a partir de tubos control en un plazo entre 48 horas y 13 días.

El antibiograma habitual consta de un tubo de control de crecimiento y de un tubo para cada uno de los fármacos, así como de un soporte para tubos con un código de barras que sirve de sujeción para el conjunto. El código de barras del soporte proporciona la identificación y el tamaño del conjunto.

a) Fundamento y utilidad de la prueba.

El kit BACTEC MGIT 960 SIRE y BACTEC MGIT 960 PZA es un procedimiento cualitativo rápido para el análisis de la sensibilidad a estreptomina, isoniacida, rifampicina, etambutol y pirazinamida respectivamente de *Mycobacterium tuberculosis*, obtenida desde cultivo.

El análisis BACTEC MGIT 960 SIRE se desarrolló con concentraciones críticas de estreptomina, isoniacida, rifampicina y etambutol ligeramente inferiores a las concentraciones críticas utilizadas en el procedimiento del método de las proporciones con el fin de evitar resultados falsos de sensibilidad. Se desarrolló una segunda concentración más alta para estreptomina, isoniacida y etambutol. Es importante analizar a una concentración más alta las cepas aisladas resistentes con el fin de identificar las cepas que presentan una resistencia de bajo grado, es decir, resistencia a la concentración crítica y sensibilidad a la concentración alta.

El uso del BACTEC MGIT 960 PZA es un método no radiométrico para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana a pirazinamida. Este kit se ha desarrollado para permitir la realización del análisis de sensibilidad a una concentración de pirazinamida de 100 µg/ mL. Este análisis de pirazinamida requiere cierta modificación de los métodos generales, ya que el antibiótico es activo in vitro sólo con valores de pH bajos. Una limitación del método es que con un pH de 5,5 muchas cepas aisladas de *M. tuberculosis* no crecen o crecen muy poco.

b) Principio de la técnica.

El kit BACTEC MGIT 960 SIRE es un análisis cualitativo con una duración de 4 a 13 días y el kit BACTEC MGIT 960 PZA tarda de 4 a 21 días. El sistema BACTEC

MGIT se basa en el crecimiento de la cepa *Mycobacterium tuberculosis* estudiada determinado por el instrumento. Los antibiogramas se introducen en el instrumento BACTEC MGIT y se analizan automáticamente. Se compara el análisis de fluorescencia de los tubos que contienen los antibióticos, con la fluorescencia del tubo de control de crecimiento (tubo sin antibiótico) para determinar los resultados de sensibilidad. El instrumento BACTEC MGIT interpreta automáticamente estos resultados e informa un resultado de sensibilidad o resistencia.

c) Preparación de antibióticos y conservación.

El kit BACTEC MGIT 960 SIRE incluye antibióticos liofilizados (S, H, R y E) enriquecido con suplemento OADC. El kit BACTEC MGIT 960 PZA incluye pirazinamida liofilizada y suplemento OADC específico. Cada frasco de antibiótico se ha de reconstruir con agua destilada estéril. Una vez reconstituidas, las soluciones de antibiótico pueden ser congeladas y almacenadas en alícuotas a una temperatura igual o inferior a -20°C durante un máximo de seis meses, siempre que este período no sobrepase la fecha de caducidad original. Una vez descongeladas, las soluciones deben utilizarse inmediatamente.

El antibiótico alícuotado y mantenido en congelación se añade a cada tubo MGIT para conseguir las concentraciones recomendadas iniciales o ampliadas en casos de resistencias.

d) Procedimiento de trabajo.

El antibiograma se debe realizar entre las 24 y 48 horas de positividad del cultivo de MGIT (si tiene menos de 24 horas puede dar error por falta de crecimiento y con más de 48 horas da error por sobrecrecimiento), siendo recomendable realizar subcultivos en caso de haberse superado este tiempo.

Deben colocarse los tubos BBL MGIT de 7 mL en el soporte de antibiogramas del tamaño apropiado. Para realizar el análisis correctamente es esencial mantener el orden adecuado de los tubos en el soporte de antibiogramas. El orden de los tubos en el soporte de antibiogramas siempre debe seguir esta regla general:

- El tubo de Growth Control (Control de crecimiento) debe estar situado en la parte más izquierda del código de barras, seguido de los tubos de estreptomicina, isoniacida, rifampicina, etambutol. La pirazinamida tiene su propio soporte pero sigue el mismo orden, el tubo control a la izquierda y el de pirazinamida a la derecha.
 - Si está utilizando las dos concentraciones de los tubos estreptomicina, isoniacida y/ o etambutol, la concentración más baja debe preceder a la más alta, de izquierda a derecha.
- Para los antibióticos SIRE:
- Añadir a cada uno de los tubos MGIT 800 µl de suplemento OADC específico.
 - Agregar 100 µl de cada antibiótico preparado a la concentración adecuada.
 - Preparar e inocular el tubo control de siembra sin antibiótico.
 - Transferir con una pipeta a los tubos que contienen antibióticos 500 µl de la suspensión de microorganismos.
 - Cerrar bien los tubos y mezclar bien los tubos invirtiéndolos suavemente entre tres y cuatro veces.
 - Introducir todos los tubos en el sistema BACTEC MGIT 960[®], que nos irá indicando las curvas de crecimientos de cada tubo.
- Para la pirazinamida:
- Se procede de forma similar, pero con su propio tubo control (C) y del tubo con pirazinamida, con la única diferencia del pH final que es más ácido.

e) Interpretación de los resultados.

El sistema detecta el crecimiento en tubo control y en cada uno de los tubos con los 5 antibióticos a las concentraciones indicadas interpretando como sensible o resistente cada tubo con antibiótico en función del crecimiento en el tubo control. En el estudio se utilizó el SIRE- P a las concentraciones iniciales recomendadas, ampliando las concentraciones al S, H y E ante la detección inicial de resistencias (Tabla 3.6).

Tabla 3.6.- Concentraciones inicial y ampliada de tuberculostáticos frente a *M. tuberculosis* en BACTEC MGIT 960®.

Fármaco	[] mg/ l inicial	[] mg/ l ampliada
Estreptomina (S)	1,0	4,0
Isoniacida (H)	0,1	0,4
Rifampicina (R)	1,0	-
Etambutol (E)	5	7,5
Pirazinamida (Z)	100	-

3.6.2.- Identificación molecular de resistencia de *M. tuberculosis* complex mediante métodos genotípicos convencionales (HAIN LifeScience®).

Ante la sospecha o confirmación mediante sistema SIRE- P de resistencias se utilizó una técnica de PCR- hibridación reversa para detección de mutaciones en los genes que la codifican. El sistema utilizado fue el GenoType (HAIN LifeScience®) basado en la tecnología ADN- STRIP que permite la identificación mediante metodología molecular de resistencia a los fármacos analizados por esta técnica, desde cultivo o directamente de material de muestras pulmonares con baciloscopia positiva.

3.6.2.1.- Confirmación molecular para la detección de resistencias a rifampicina y/ o isoniacida mediante el GenoType MTBDRplus®.

a) Fundamento y utilidad de la prueba.

Es un ensayo cualitativo in vitro para la identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y su resistencia a rifampicina y/ o isoniacida, desde muestras clínicas pulmonares, baciloscopias positivas o negativas y muestras de cultivos. La identificación de resistencia a rifampicina es posible gracias a la detección de las mutaciones más significativas del gen *rpoB* (que codifica la subunidad β del ARN polimerasa). Para testar la resistencia a isoniacida de alto nivel se examina el gen *katG* (que codifica la catalasa peroxidasa), y para la resistencia a isoniacida de bajo nivel, se estudia la región del promotor del gen *inhA* (que codifica la NADH enoil ACP reductasa).

b) Principio de la técnica.

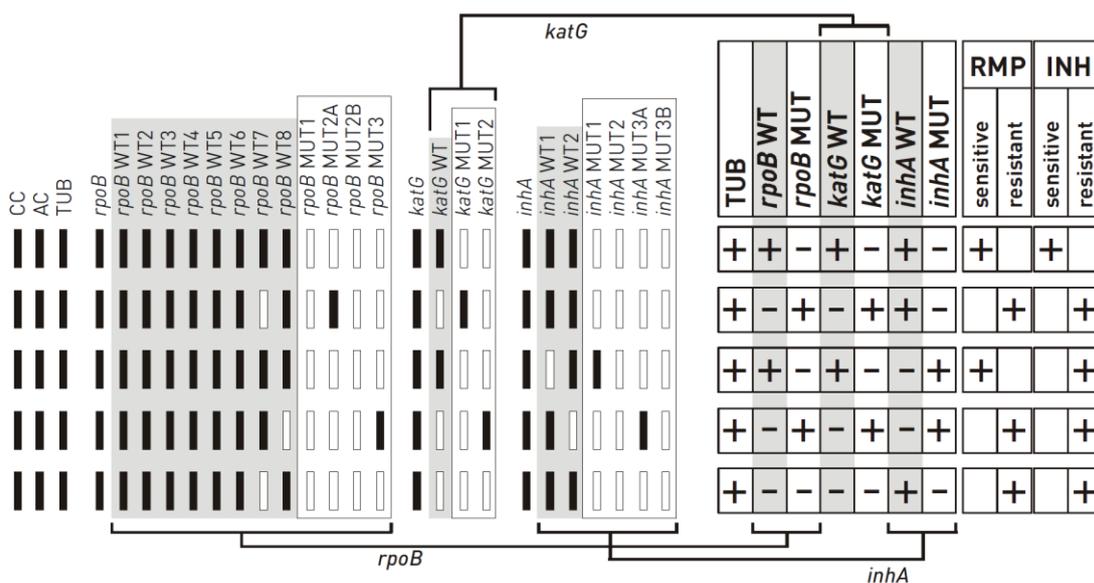
El procedimiento completo se divide en tres pasos: i) extracción de ADN procedente de cultivo o de muestra clínica; ii) amplificación multiplex con cebadores marcados con biotina; y iii) hibridación reversa sobre membrana.

c) Procedimiento de trabajo.

Sigue el mismo procedimiento de trabajo con extracción, amplificación e hibridación que el método utilizado para la identificación de especie (GenoType MTBC Ver 1.X HAIN LifeScience®) con la única variante del perfil de amplificación, siendo:

			Muestra Cultivo	Muestra Clínica
15 minutos	95°C		1 ciclo	1 ciclo
30 segundos	95°C	}	10 ciclos	20 ciclos
2 minutos	65°C			
25 segundos	95°C	}	20 ciclos	30 ciclos
40 segundos	50°C			
40 segundos	70°C			
8 minutos	70°C		1 ciclo	1 ciclo

d) Interpretación de los resultados.



Se basa en la observación de las bandas de hibridación sobre papel y análisis de ausencia/ presencia de cada una de ellas.

- Control de Conjugado (CC): debe aparecer una línea en esta zona para confirmar así la eficacia del conjugado unido y la reacción del sustrato.
- Control de Amplificación (AC): cuando el ensayo se realiza correctamente, un amplicón control se une a la zona del Control de Amplificación. Si esta banda se desarrolla se pueden excluir errores durante la preparación y desarrollo de la reacción de amplificación. Se utiliza la intensidad de reacción colorimétrica de esta banda como mínimo para considerar cada banda restante como positiva.
- *M. tuberculosis* complex (TUB): zona híbrida con amplicones generados de todos los miembros de MTB. Si la zona TUB es negativa, la bacteria testada no pertenece al complejo *M. tuberculosis* y por tanto no debe ser evaluada mediante este sistema.
- Locus Control (*rpoB*, *katG* e *inhA*): las zonas del locus control detectan una región del gen específica para cada respectivo locus, apareciendo por tanto si la técnica está correctamente realizada.
- Sondas “wild type”: estas sondas comprenden las áreas de resistencia más importantes de los genes respectivos. Cuando todas las sondas de un gen son positivas, no se detectan mutaciones en las regiones examinadas por lo que la cepa testada sería sensible para el respectivo antibiótico. En caso de una mutación, el respectivo amplicón no puede unirse a la correspondiente sonda “wild type” dando una ausencia de señal al menos en una de las sondas. Esto indica por tanto resistencia de la cepa testada al respectivo antibiótico. La ausencia de amplificación en las “wild type” supondría mutaciones de resistencia para rifampicina (*rpoB*), resistencias de alto nivel a isoniacida (*katG*) y/ o resistencias de bajo nivel a isoniacida (*inhA*) en las cepas testadas. (Tabla 3.7).

Tabla 3.7.- Mutaciones en genes, *rpoB*, *katG* y/o *inhA* y sus correspondientes “wild type” detectados mediante MTBDRplus®.

a) *rpoB*: se examina para la detección de resistencias a rifampicina

Ausencia wild type	banda	Codón analizado	Desarrollo de banda de mutación	Mutación
<i>rpoB</i> WT1		505-509		F505F, T508A, S509T
<i>rpoB</i> WT2		510-513		L511P
<i>rpoB</i> WT2/WT3		510-517		Q513L, Q513P del 514-516
<i>rpoB</i> WT3/WT4		513-519	<i>rpoB</i> MUT1	D516V D516Y del 515
<i>rpoB</i> WT4/WT5		516-522		Del 518, N518I
<i>rpoB</i> WT5/WT6		518-525		S522L, S522Q
<i>rpoB</i> WT7		526-529	<i>rpoB</i> MUT2A <i>rpoB</i> MUT2B	H526Y H516D H526R, H526P, H526Q, H526N, H526L, H526S, H526C
<i>rpoB</i> WT8		530-533	<i>rpoB</i> MUT3	S531L D531Q, S531W, L533P

b) *katG*: se examina para la detección de resistencias a isoniacida.

Ausencia de banda wild type	Codón analizado	Desarrollo de banda de mutación	Mutación
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1 <i>katG</i> MUT2	S315T1 S315T2

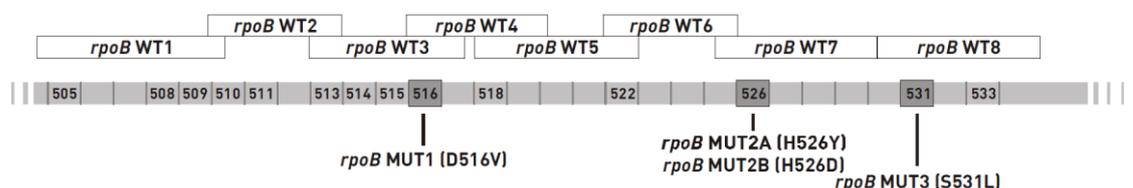
c) *inhA*: se examina para la detección de resistencias a isoniacida.

Ausencia de banda wild type	Posición del ácido nucleico analizado	Desarrollo de banda de mutación	Mutación
<i>inhA</i> WT1	-15 -16	<i>inhA</i> MUT1 <i>inhA</i> MUT2	C15T A16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A <i>inhA</i> MUT3B	T8C T8A

- Sondas de mutación: las sondas de mutación detectan algunas de las resistencias más comunes mediadas por mutaciones. Esta técnica detecta mutaciones en el gen *rpoB* para resistencia a rifampicina, en el gen *katG* (S315T) para resistencia a isoniacida de alto nivel y en la región promotora del gen *inhA* (nucleótidos -8, -15, y -16) para resistencia a isoniacida de bajo nivel. Las mutaciones detectadas mediante este sistema son:

a) Resistencia a rifampicina: *rpoB* MUT2A y MUT2B. Esta se encuentra prácticamente en todos los casos relacionada con alteraciones en el gen *rpoB*, que codifica la subunidad β del ARN polimerasa, causando interferencias en la transcripción. La mayoría de las cepas tienen alteraciones en una zona de 81 pares de bases del gen que se conoce como *región determinante de resistencia a rifampicina*. Las mutaciones más frecuentes son las que afectan a los codones 505- 533 (Figura 3.5).

Figura 3.5.- Región determinante de resistencia a rifampicina. Parte del genoma de *M. tuberculosis* con indicación de principales mutaciones sensibles a rifampicina.



b) Resistencia a isoniacida: *katG* MUT1 y MUT2 e *inhA* MUT1, MUT2, MUT3A y MUT3B. Esta resistencia se asocia fundamentalmente a dos genes: el *katG* y el *inhA*. El primero codifica la enzima catalasa peroxidasa, implicada en la transformación de la isoniacida en su compuesto activo. Determinadas alteraciones del gen provocan resistencia al impedir la activación del fármaco. La mutación más frecuente en este gen afecta al codón 315, provocando un cambio de aminoácido. El gen *inhA* codifica la enzima enoíl ACP reductasa que participa en la síntesis de la pared bacteriana. En la zona reguladora del gen se han descrito mutaciones que provocan un aumento de la enzima, compensando la acción inhibidora del antibiótico. También se

han descrito, aunque menos frecuentes, mutaciones en la zona estructural del gen, que modificarían la enzima impidiendo su reconocimiento por parte del antibiótico.

3.6.2.2- Confirmación molecular para la detección de resistencias a fluoroquinolonas, aminoglicósidos y/ o etambutol mediante el GenoType MTBDRs/ V.1.0®.

a) Fundamento y utilidad de la prueba.

Es un ensayo cualitativo in vitro para la identificación genética del complejo *M. tuberculosis* y su resistencia a fluoroquinolonas (FLQ; ofloxacino y moxifloxacino), aminoglicósidos/ péptidos cíclicos (AG/ CP; antibióticos inyectables como kanamicina, amikacina/capreomicina, viomicina) y /o etambutol (E) a partir de cultivo o muestra pulmonar con baciloscopia positiva.

La identificación de la resistencia a fluoroquinolonas está posibilitada mediante la detección de las mutaciones asociadas más significativas del gen *gyrA* (que codifica por la subunidad A del ADN girasa). Para la detección de las resistencias a aminoglicósidos/ péptidos cíclicos se examina el gen 16 rRNA (*rrs*) y para la detección de la resistencia a etambutol se examina el gen *embB* (el cual, junto al gen *embA* y el *embC*, codifican la arabinosil transferasa).

b) Principio de la técnica.

El procedimiento completo se divide en tres pasos: i) extracción de ADN procedente de cultivo o de muestra clínica; ii) amplificación multiplex con cebadores marcados con biotina; y iii) hibridación reversa sobre membrana.

c) Procedimiento de trabajo.

Sigue el mismo procedimiento de trabajo en la extracción, que el método utilizado para la detección de resistencias a isoniacida y rifampicina (GenoType MTBDR_{plus} HAIN LifeScience®) hay dos pequeñas diferencias una en la amplificación. En este caso las cantidades necesarias por muestra son:

- 35µl de PNM (Primer)
- 5µl Buffer x10 de PCR
- 2µl de solución MgCl₂
- 0,2µl de polimerasa HotStarTaq
- 3µl de agua destilada esteril
- 5µl de solución de ADN

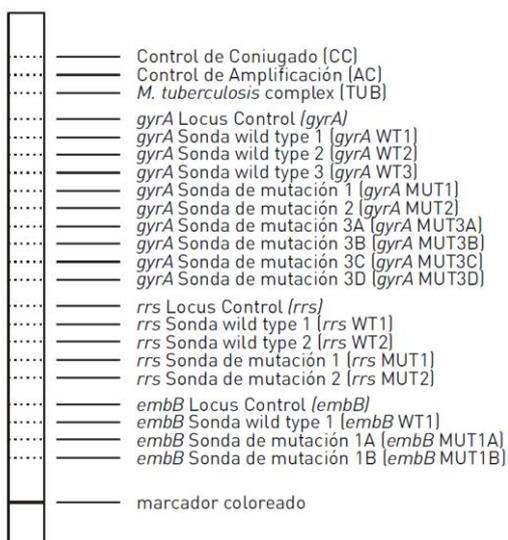
Alicuotar 45 µl del mix preparado en tubos de PCR y añadir 5 µl de solución ADN, para obtener un volumen final de 50µl.

Perfil de amplificación:

			Muestra Cultivo	Muestra Clínica
15 minutos	95°C		1 ciclo	1 ciclo
30 segundos	95°C	}	10 ciclos	20 ciclos
2 minutos	58°C			
25 segundos	95°C	}	20 ciclos	30 ciclos
40 segundos	53°C			
40 segundos	70°C			
8 minutos	70°C		1 ciclo	1 ciclo

Y la otra diferencia es en la hibridación, en este caso necesitamos 40 µl de buffer y 40µl de muestra amplificado, el resto del proceso de hibridación se mantiene igual.

d) Interpretación de los resultados.



Las sondas “wild type” comprenden las áreas de resistencia más importantes de los genes respectivos y las sondas de mutación detectan algunas de las resistencias más comunes mediadas por mutaciones ver tabla 3.8 y figura 3.6.

Tabla 3.8.- Mutaciones en genes *gyrA*, *rrs* y *embB* y sus correspondientes “wild type” detectados mediante MTBDRs/ V.1.0®.

a) *gyrA*: se examina para la detección de resistencias a fluoroquinolonas.

Ausencia de banda wild type	Desarrollo banda de mutación	Mutación	Resistencia fenotípica
<i>gyrA</i> WT1	---	G88A	FLQ
		G88C	
<i>gyrA</i> WT2	<i>gyrA</i> MUT1	A90V	
	<i>gyrA</i> MUT2	S91P	
<i>gyrA</i> WT3	<i>gyrA</i> MUT3A	D94A	
	<i>gyrA</i> MUT3B	D94N	
		D94Y	
	<i>gyrA</i> MUT3C	D94G	
	<i>gyrA</i> MUT3D	D94H	

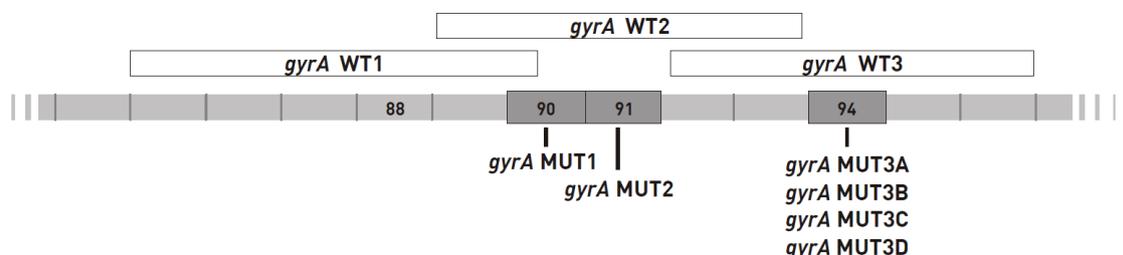
b) *rrs*: se examina para la detección de resistencias a aminoglicosidos/ péptidos cíclicos (kanamicina, amikacina, capreomicina y viomicina).

Ausencia banda wild type	Ácido nucleico analizado Posición	Desarrollo banda de mutación	Mutación	Resistencia fenotípica			
<i>rrs</i> WT1	1401	<i>rrs</i> MUT1	A1401G	CAP	---	AMK	KAN
	1402	---	C1402T	CAP	VIO	---	KAN
<i>rrs</i> WT2	1484	<i>rrs</i> MUT2	G1484T	CAP	VIO	AMK	KAN

c) *embB*: se examina para la detección de resistencias a etambutol.

Ausencia banda wild type	Desarrollo banda de mutación	Mutación	Resistencia fenotípica
<i>embB</i> WT	<i>embB</i> MUT1A	M306I	EMB
	<i>embB</i> MUT1B	M306V	
		V306I	

Figura 3.6.- Regiones de resistencia a fluoroquinolonas del gen *gyrA*. Los números especifican las posiciones de los aminoácidos para todas las mutaciones listadas en la tabla.



3.6.2.3- Confirmación molecular para la detección de resistencias a fluoroquinolonas y/ o aminoglicósidos mediante el GenoType MTBDRs/ V.2.0®.

a) Fundamento y utilidad de la prueba.

Es un ensayo cualitativo in vitro, para la identificación genética del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y su resistencia a fluoroquinolonas (FQ; ofloxacino y moxifloxacino) y aminoglicósidos/ péptidos cíclicos (AG/ CP; antibióticos inyectables como kanamicina, amikacina, capreomicina y viomicina) a partir de muestras de esputo baciloscopia negativa o positiva, y muestras de cultivo. La detección de la resistencia a fluoroquinolonas está activada por la detección de las principales mutaciones asociadas a resistencia de los genes *gyrA* y *gyrB* (que codifica la subunidad A y la subunidad B del ADN girasa, respectivamente). Para la detección de resistencia a aminoglicósidos/ péptidos cíclicos se examina el gen 16S rRNA (*rrs*), para la detección de resistencia de bajo nivel a la kanamicina, se examina la región promotora del gen *eis* (que codifica la acetiltransferasa) (Tabla 3.9).

b) Principio de la técnica.

El procedimiento completo se divide en tres pasos: i) extracción de ADN procedente de cultivo o de muestra clínica; ii) amplificación multiplex con cebadores marcados con biotina; y iii) hibridación reversa sobre membrana.

c) Procedimiento de trabajo.

Sigue el mismo procedimiento de trabajo con extracción, amplificación e hibridación que el método utilizado para la detección de resistencias a isoniacida y rifampicina (GenoType MTBDR*plus* HAIN LifeScience®).

d) Interpretación de los resultados

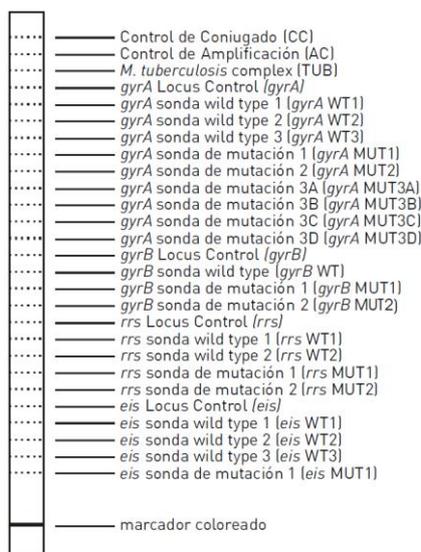


Tabla 3.9.- Mutaciones en genes *gyrA*, *gyrB*, *rrs* y *eis* y sus correspondientes “wild type” detectados mediante MTBDR*s*/ V.2.0®.

a) *gyrA*: se examina para la detección de resistencias de fluoroquinolonas.

Ausencia de banda wild type	Desarrollo banda de mutación	Mutación	Resistencia fenotípica
<i>gyrA</i> WT1	---	G88A	FLQ
		G88C	
<i>gyrA</i> WT2	<i>gyrA</i> MUT1	A90V	
	<i>gyrA</i> MUT2	S91P	
<i>gyrA</i> WT3	<i>gyrA</i> MUT3A	D94A	
	<i>gyrA</i> MUT3B	D94N	
		D94Y	
	<i>gyrA</i> MUT3C	D94G	
	<i>gyrA</i> MUT3D	D94H	

b) *gyrB*: se examina para la detección de resistencias a fluoroquinolonas.

Ausencia de banda wild type	Desarrollo banda de mutación	Mutación	Resistencia fenotípica
<i>gyrB</i> WT	<i>gyrB</i> MUT1	N538D	FLQ
	<i>gyrB</i> MUT2	E540V	

c) *rrs*: se examina para la detección de resistencias a aminoglicosidos/ péptidos cíclicos (kanamicina, amikacina, capreomicina y viomicina).

Ausencia banda wild type	Ácido nucleico analizado Posición	Desarrollo banda de mutación	Mutación	Resistencia fenotípica			
<i>rrs</i> WT1	1401	<i>rrs</i> MUT1	A1401G	CAP	---	AMK	KAN
	1402	---	C1402T	CAP	VIO	---	KAN
<i>rrs</i> WT2	1484	<i>rrs</i> MUT2	G1484T	CAP	VIO	AMK	KAN

d) *eis*: se examina para la detección de resistencias a bajo nivel de kanamicina.

Ausencia de banda wild type	Desarrollo banda de mutación	Mutación	Resistencia fenotípica
<i>eis</i> WT1	---	G-37T	Bajo Nivel KAN
<i>eis</i> WT2	<i>eis</i> MUT1	C-14T	
	---	C-12T	
<i>eis</i> WT3	---	G-10A	
	---	C-2A	

3.7.- Secuenciación de cepas MDR-TB mediante MiSeq de Illumina®

La secuenciación mediante la tecnología de secuenciación de MiSeq de Illumina®, basada en la generación de grupos y secuenciación por síntesis (SBS) se realizó sobre casos seleccionados, incluyendo, como criterio las cepas clínicas identificadas como MDR-TB y/ o XDR-TB, demostradas como MDR-TB y/ o XDR-TB por estudio fenotípico y/ o genotípico para la detección de las variantes relacionadas con resistencia y la posible identificación de nuevas mutaciones asociadas.

Esta metodología se realizó en el laboratorio de bioseguridad de nivel 3 de la Unidad de Genómica de la Tuberculosis, en el Área de Genómica y Salud del FISABIO (Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana), durante una estancia de 9 meses. Este proceso se incluye en el convenio del Grupo de trabajo de la Tuberculosis de la Comunidad Valenciana donde están incluidos distintos hospitales de la Comunitat Valenciana, en donde se remiten de forma rutinaria cepas clínicas de los casos positivos de *M. tuberculosis* complex en esta comunidad.

A todas las muestras seleccionadas, se les realizó el siguiente protocolo:

a) Siembra para obtención de material biológico.

Las cepas seleccionadas, previamente crecidas durante 2- 3 semanas en cultivos clínicos de Löwenstein- Jensen y/ o en medio líquido de MGIT, se resembraron sobre toda la superficie de placas de agar 7H11 (BD[®]) incubadas a 37°C un mínimo de 21 días para la obtención de abundante material biológico.

La composición del medio 7H11, preparada en el laboratorio es:

Medio liofilizado BBL [™] Seven H11 Agar Base (BD [®]) Glicerol al 92% BBL [™] Middlebrook OADC enriquecimiento (BD [®]) Agua MiliQ (agua ultrapura)

b) Inactivación del ADN.

A partir de las placas sembradas en agar 7H11, se recuperó para cada cepa, tres asadas en un tubo eppendorf y se procedió a la inactivación del ADN de *M. tuberculosis*.

- Reactivos:

TE 1X (Tris con EDTA): 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 ± 0.2
--

- El procedimiento de inactivación de la bacteria, se realizó a partir de los siguientes pasos:

- Añadir 1mL de agua estéril en un tubo eppendorf de 2mL con rosca que contenga 3- 4 perlas de cristal esterilizadas.
- Recoger con un asa de siembra toda la masa de las colonias crecidas en cada placa 7H11 e introducirla en el tubo eppendorf.
- Vortear bien el tubo, para disgregar las bacterias.
- Centrifugar el tubo a 13.000 rpm/ 3 minutos.
- Decantar el sobrenadante y añadir TE1X.
- Calentar durante 30min a 80°C en un termobloque.
- Guardar a -20°C hasta poder realizar el proceso de extracción.

c) Extracción del ADN.

- Reactivos:

Lisozima (10mg/ml) Mix SDS (70µl/ muestra) + Proteinasa K (5uL/muestra) NaCl 5M Solución CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio)/ NaCl: 10% disuelto en 0.7M de NaCl Cloroformo/ Isoamílico (24:1) Isopropanol Etanol al 70% Agua MiliQ
--

Sobre la masa previamente inactivada, se realizaron los siguientes pasos para extraer el ADN:

- Descongelar cada tubo con la masa inactivada mantenida a -20°C.
- Añadir 75 µl de lisozima a cada tubo y agitar con vórtex.
- Incubar los tubos a 37°C/ 15 horas (overnight).
- Añadir 75 µl del mix SDS/ Proteinasa K a cada tubo, agitar e incubar a 65°C durante 10 minutos.
- Añadir 100µl NaCl 5M y agitar invirtiendo el tubo.
- Añadir 100µl de la solución CTAB/ NaCl, vortear fuerte e incubar a 65°C durante 10 minutos.
- Añadir 750 µl cloroformo/ Isoamílico y agitar por inversión el tubo varias veces.
- Centrifugar a 12.000 rpm/ 10 minutos a 4°C para separar las fases.

- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo con rosca de 2ml.
- Añadir 450 µl isopropanol y mezclar bien invirtiendo el tubo.
- Centrifugar a 13.000 rpm/ 15 minutos a 4°C.
- Decantar el sobrenadante y añadir de nuevo 450µl isopropanol.
- Congelar los tubos a -20°C durante una hora.
- Centrifugar a 13.000 rpm/ 15 minutos a temperatura ambiente.
- Decantar el sobrenadante y dejar el pellet.
- Añadir 1 ml de etanol al 70%, mantenido a -20°C y mezclar por inversión del tubo.
- Centrifugar a 12.000 rpm/ 5 minutos a temperatura ambiente.
- Decantar todo el sobrenadante.
- Centrifugar al vacío con centrifuga de Speed- Vac para eliminar los residuos de etanol.
- Resuspender el pellet con 100µ de agua MiliQ y guardar el tubo en el congelador a -20°C hasta que se vaya a cuantificar.

La concentración inicial de ADN es clave para una correcta secuenciación, por ello se ajustó mediante dilución con agua estéril hasta 0,2 ng, para poder emplear 5 µl y tener una concentración mínima de 1ng. La medición del ADN, se llevó a cabo con el fluorómetro Qubit® 3.0 (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante (concentración de 0,5ng/ µl en un volumen final de 20µl).

La calidad del ADN se estudió utilizando el nanodrop (Thermo Scientific), viendo si la frecuencia está entre 230 a 260 nm.

d) Realización de librerías genómicas y Secuenciación en MiSeq de Illumina.

Una vez obtenido el ADN extraído, se realizaron las librerías genómicas siguiendo el protocolo de Nextera®- XT ADN de Illumina utilizando el kit comercial de preparación de librerías genómicas de Nextera®- XT ADN de Illumina (Illumina, San Diego, EE.UU) para su secuenciación en grupo.

Esta tecnología realiza la fragmentación del ADN mediante el proceso de *tagmentación* que consiste en la fragmentación del ADN y a la vez que se van añadiendo

adaptadores. Esta técnica se basa en la combinación de una transposasa y un adaptador uniéndose al ADN, se fragmenta el ADN y se añaden los adaptadores, después se realiza una PCR para agregar las secuencias cebador y los índices de secuenciación de modo que se pueden secuenciar varias cadenas cortas y después unirlos para recuperar largas secuencias de genoma completo.

La calidad de las librerías se comprobó mediante un chip de BioAnalyzer (Agilent 2100®), lo ideal es que el tamaño de los fragmentos de ADN esté entre 600 y 700 pares de bases. La secuenciación se llevó a cabo utilizando el kit de secuenciación MiSeq Reagent kit v3 (Illumina), en la plataforma MiSeq de Illumina®.

e) Análisis bioinformático de secuencias obtenidas.

El análisis genómico para la detección de variantes asociadas a resistencia a fármacos en *M. tuberculosis*, se determina mediante la identificación de polimorfismos de un único nucleótido (SNPs), o pequeñas deleciones o inserciones (INDELS), en genes conocidos asociados a resistencia fenotípica. Las secuencias obtenidas se compararon con la cepa de referencia H37Rv y con las variantes de mutaciones conocidas. El análisis de los SNPs e INDELS se realizó mediante los programas bioinformáticos: i) *Kvarq*⁽¹²⁵⁾: este sistema realiza un genotipado rápido para los loci seleccionados (SNPs filogenéticos, las mutaciones de resistencia a fármacos) en secuencias del genoma y ii) *PhyResSE*⁽¹²⁶⁾, diseñado para el diagnóstico y detección de resistencia a los fármacos de *Mycobacterium tuberculosis* complex y para la clasificación de los linajes correspondientes a cada cepa.

La pauta para valorar la calidad de las secuencias y la fiabilidad de las mutaciones basadas en el sistema *PhyResSE*⁽¹²⁶⁾ son: i) realización mínima de cinco lecturas correctas; ii) tener al menos doce pares de bases de distancia entre los SNPs; y iii) obtener una buena concordancia en ambas direcciones después de la lectura (Tabla 3.10).

Tabla 3.10.- Resistencias más comunes conocidas detectadas por *PhyResSE*^(modificado de 122)

ID Gen/ Nombre Gen	Inicio Gen	Fin Gen	Antituberculoso
Rv0667/ <i>rpoB</i>	759807	763325	R
Rv1908c/ <i>katG</i>	2156111	2153889	H
Rv1484/ <i>inhA</i>	1674202	1675011	H
Rv1483/ <i>fabG1</i>	1673440	1674183	H
Rv0682/ <i>rpsL</i>	781560	781934	S
MTB000019/ <i>rrs</i>	1471846	1473382	S
Rv3793/ <i>embC</i>	4239863	4243147	E
Rv3794/ <i>embA</i>	4243233	4246517	E
Rv2043c/ <i>pncA</i>	2289241	2288681	Z
Rv0005/ <i>gyrB</i>	5240	7267	FQ
Rv0006/ <i>gyrA</i>	7302	9818	FQ
Rv2416c/ <i>eis</i>	2715332	2714124	KAN
Rv3795/ <i>embB</i>	4246514	429810	E

R: rifampicina; H: isoniacida; S: estreptomycin; E: etambutol
Z: pirazinamida FQ: fluoroquinolonas; KAN: kanamicina.

Se organizaron los datos en tablas y se buscaron los genes de interés. Para la detección de resistencia se miraron los genes no sinónimos y no esenciales y para el linaje de MTB los genes esenciales y sinónimos. Hay descritos muchos SNPs de referencia tanto para resistencias como para linajes y sublinajes conocidos como marcadores filogenéticos, que son los más habituales y conocidos, son los que primero se buscaron. Toda esta información se recogió y se estudió la procedencia del paciente, los posibles contagios y las resistencias fenotípicas y/ o genotípicas comerciales obtenidas en cada cepa.

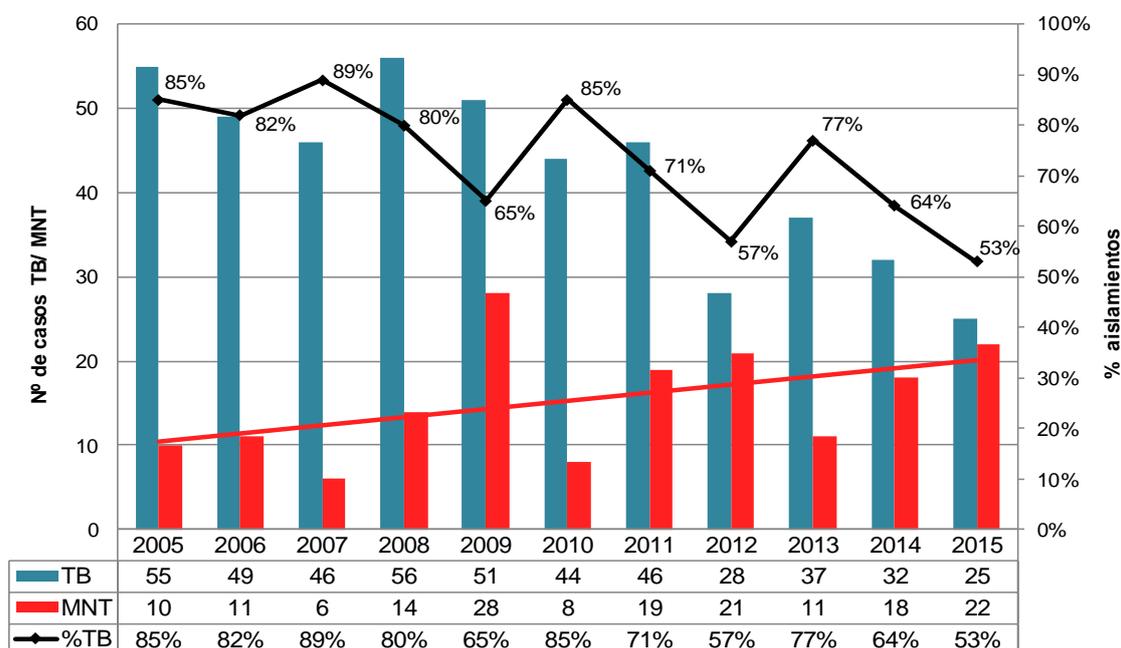
4.-Resultados

4.1.- Tuberculosis confirmadas en el Departamento de Salud Valencia- Doctor Peset durante el periodo 2005- 2015.

4.1.1.- Casos con aislamientos de *Mycobacterium* spp.

A lo largo de los once años de estudio (2005 a 2015) se diagnosticaron 640 casos con aislamiento positivo para micobacterias, de los que 469 casos correspondieron a *Mycobacterium tuberculosis* complex (73,6%) y los 168 casos restantes (26,4%) a aislamientos de micobacterias no tuberculosas (MNT). La comparación del número y porcentaje de casos con aislamiento de MTB y de MNT a lo largo de los años se muestra en la figura 4.1. Se describe un descenso progresivo de casos confirmados de TB, que pasa de 55 casos (84,6%) en 2005 a 25 (53,2%) en 2015, con oscilaciones a lo largo del periodo. Los casos por MNT van aumentando, con el tiempo, pasando del 15,4% (10 casos) de 2005 al 46,8% (22 casos) de 2015.

Figura 4.1.- Distribución en el Departamento de Salud Valencia- Dr. Peset de casos de MTB y de MNT (2005- 2015).



Estos datos de aislamiento de MTB y MNT se detectaron a partir del procesamiento en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Dr. Peset de un total de 46.505 muestras tomadas de 21.392 pacientes con petición expresa de "estudio de micobacterias" por sospecha de tuberculosis (TB) o micobacteriosis (Tabla 4.1). Del

total de muestras estudiadas se obtuvieron 1.286 cultivos (2,8%) con aislamiento de *M. tuberculosis* complex (MTB), correspondientes a 469 pacientes (2,2%) con diagnóstico de TB confirmada en el Departamento de Salud Valencia- Dr. Peset. Se observa, tal y como se describe en la tabla, un progresivo incremento del número de muestras procesadas a lo largo de los años. El número de aislamientos para TB hasta el año 2011 varía con pocas oscilaciones, pero a partir de ahí empieza a descender. Sin embargo, el número de pacientes estudiados se mantuvo a lo largo de todo el estudio, con mínimas variaciones. Los casos nuevos de TB diagnosticados a lo largo de todo el periodo de estudio van descendiendo progresivamente con los años. La ratio muestra/paciente indica una proporción 2:1 a lo largo de todo el periodo, excepto en el año 2015 que pasa a ser 3:1.

Tabla 4.1.- Distribución por años de aislamientos de MTB y casos de tuberculosis desde muestras remitidas al Servicio de Microbiología del HU Dr. Peset.

Año	Nº de Muestras	Aislados MTB (n / %)	Nº de Pacientes	Casos TB (n / %)
2005	3465	77 / 2,2	1884	55 / 2,9
2006	3928	113 / 2,9	1924	49 / 2,5
2007	3772	145 / 3,8	1790	46 / 2,6
2008	4088	139 / 3,4	1844	56 / 3
2009	4140	141 / 3,4	1766	51 / 2,9
2010	4060	128 / 3,2	2104	44 / 2,1
2011	4364	152 / 3,5	2252	46 / 2
2012	4321	107 / 2,5	1962	28 / 1,2
2013	4436	101 / 2,3	1925	37 / 1,9
2014	4904	109 / 2,2	1986	32 / 1,6
2015	5027	74 / 1,5	1955	25 / 1,3
Total	46505	1286 / 2,8	21392	469 / 2,2

Cada caso/ paciente, de los 640 detectados correspondieron a pacientes distintos. A todos ellos se les hizo inicialmente un estudio de sensibilidad para fármacos de primera línea en el caso de ser MTB o un estudio de identificación de especie y/ o estudio de sensibilidad en su caso si se trataba de una MNT.

Al recibir más de una muestra con el tiempo de cada paciente, se consideró en este estudio como “episodio nuevo” de paciente conocido si las muestras con aislamientos eran tras un periodo de tres meses (paciente “SA”) desde la inicial o a partir

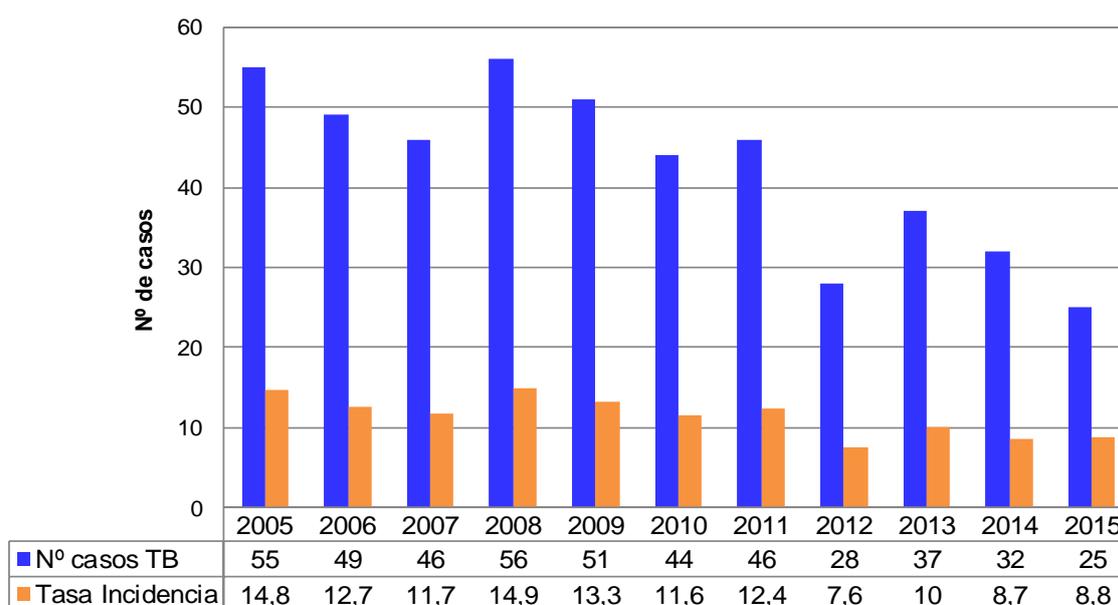
de un año (paciente "SP"). En estos episodios nuevos se les volvió a hacer un estudio de sensibilidad en los MTB y confirmación de especie en los MNT. Así, entre los 469 pacientes con MTB se detectaron 513 si se toman todos los episodios nuevos. En el caso de las MNT se pasó de los 168 pacientes totales a 233 casos considerando todos los episodios nuevos. Este incremento fue más acusado en los últimos años.

4.1.2.- Incidencia de casos de TB confirmada en el área. Comparación con los datos de los informes de la Comunitat Valenciana.

Para el cálculo de incidencia de casos/ 10^5 habitantes, se tomaron los datos de la población estudiada en el HUDr. Peset en el periodo 2005- 2015, con una media de 368.378 habitantes.

En la figura 4.2.1 se puede observar tanto el número de casos como la tasa de incidencia/ 10^5 habitantes en el Departamento de Salud Valencia Dr. Peset detectadas y declaradas como TB confirmada a lo largo del periodo estudiado.

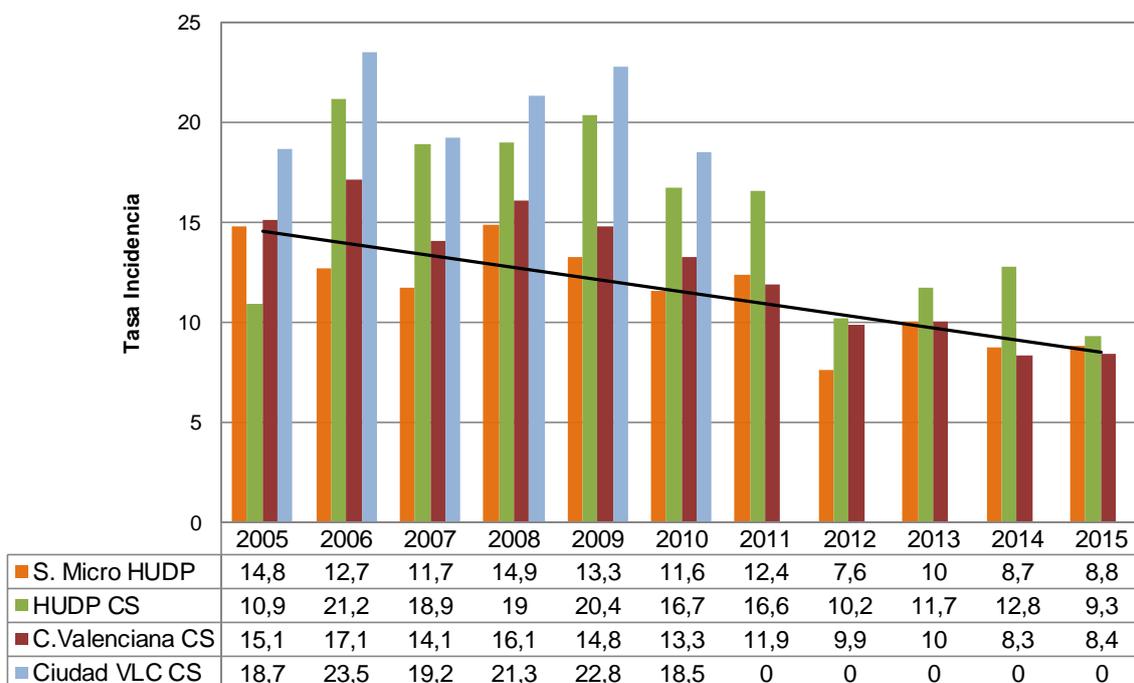
Figura 4.2.1.- Número de tasa de incidencia y casos de TB confirmadas por años desde el Servicio de Microbiología en el Departamento de Salud Valencia Dr. Peset.



Estas tasas de incidencia/ 10^5 habitantes confirmadas desde el Servicio de Microbiología del Departamento de Salud Valencia- Doctor Peset a lo largo del periodo de estudio se comparan con los datos declarados por Conselleria de Sanitat de la Comunitat Valenciana en sus Informes de Salud- TB ^(17,27-31,127), tanto para el HUDr. Peset, como con las tasas de incidencia declaradas en la ciudad de Valencia y la tasa de incidencia global de la Comunitat Valenciana (Figura 4.2.2).

La incidencia obtenida desde los datos del Servicio de Microbiología de TB confirmadas disminuyó progresivamente, con una media de 11,6 casos/ 10^5 habitantes, y pasando de una tasa de 14,8 inicial en 2005 a un 8,8 en 2015. Los datos confirmados por el laboratorio y los declarados según Conselleria de Sanitat para este Departamento de Salud en los primeros años del estudio son dispares, aunque se van igualando al final del periodo analizado. Las tasas en la Comunitat Valenciana son ligeramente superiores, pero con la misma tendencia al descenso, principalmente desde 2008 y en particular en el último año (2015). Aun así, no se observan diferencias significativas en la incidencia en nuestro Departamento de Salud con el resto de los de la Comunitat Valenciana.

Figura 4.2.2- Comparación de incidencia según origen de datos y zona estudiada en la Comunitat Valenciana según informes de Salud- TB ^(17,27-31,127).

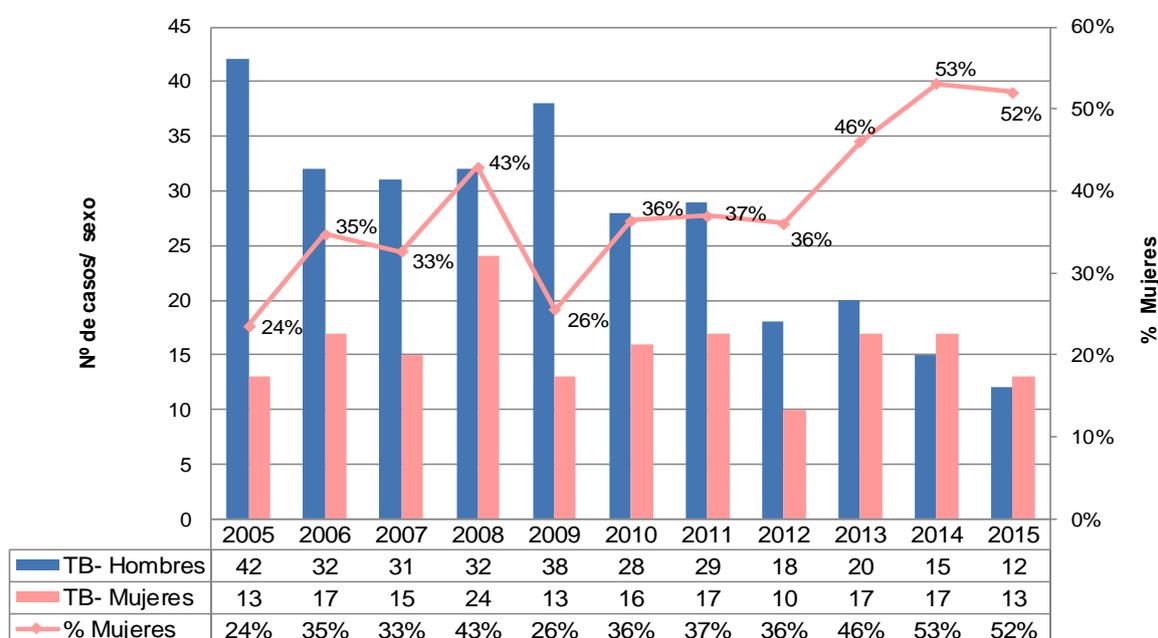


4.2.- Características de la población con tuberculosis confirmada.

4.2.1.- Distribución por sexo y grupos de edad de los pacientes estudiados.

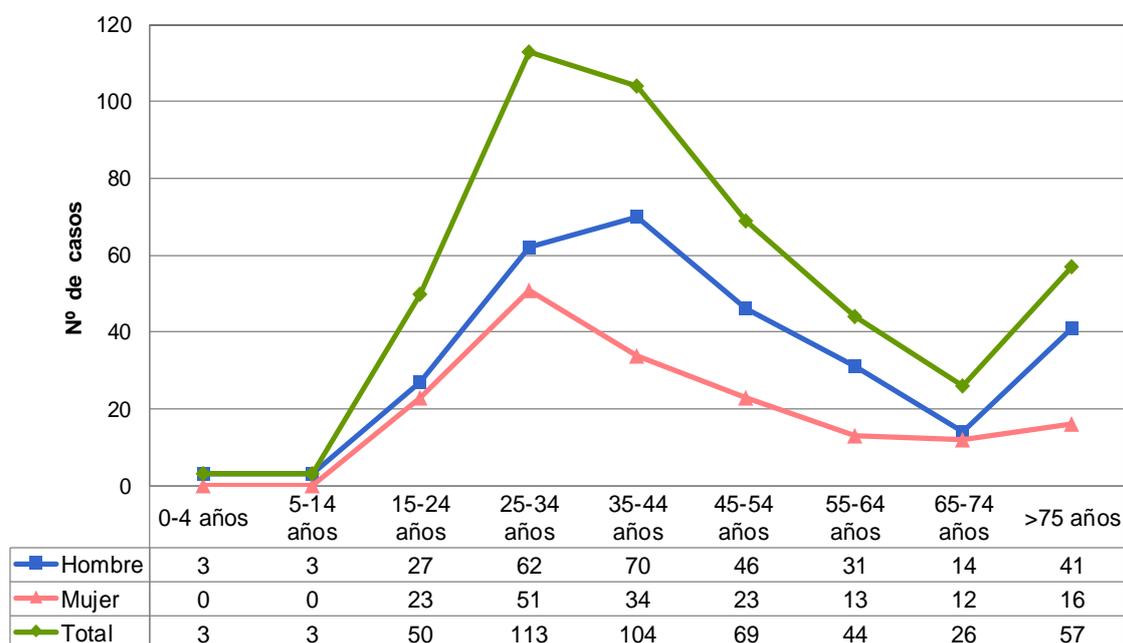
La distribución de casos TB por sexo se muestra en la figura 4.3. La relación global Hombre: Mujer fue aproximadamente de 2:1 (297 Hombres- 63,3% y 172 Mujeres- 36,7%). La relación varía a lo largo del estudio ya que mientras en los primeros años fue del 76% de hombres y 24% de mujeres, el porcentaje de casos TB en éstas va aumentando hasta llegar al 52- 53% en los dos últimos años de estudio ($p=0,0121$).

Figura 4.3.- Distribución temporal y por sexo de casos de TB.



La distribución de TB por grupos de edad se muestra en la figura 4.4 incluyendo además en ella la diferenciación por sexo. Se observan tasas más elevadas en los intervalos de edad de 25- 34 y 35- 44 años (con 113 y 104 casos respectivamente), seguido del grupo de 45- 54 años (69 casos) y del grupo de más de 75 años, con 57 casos. Sólo se detectaron 6 casos (1,3%), todos ellos en varones, con TB confirmada por cultivo en edad pediátrica (≤ 14 años).

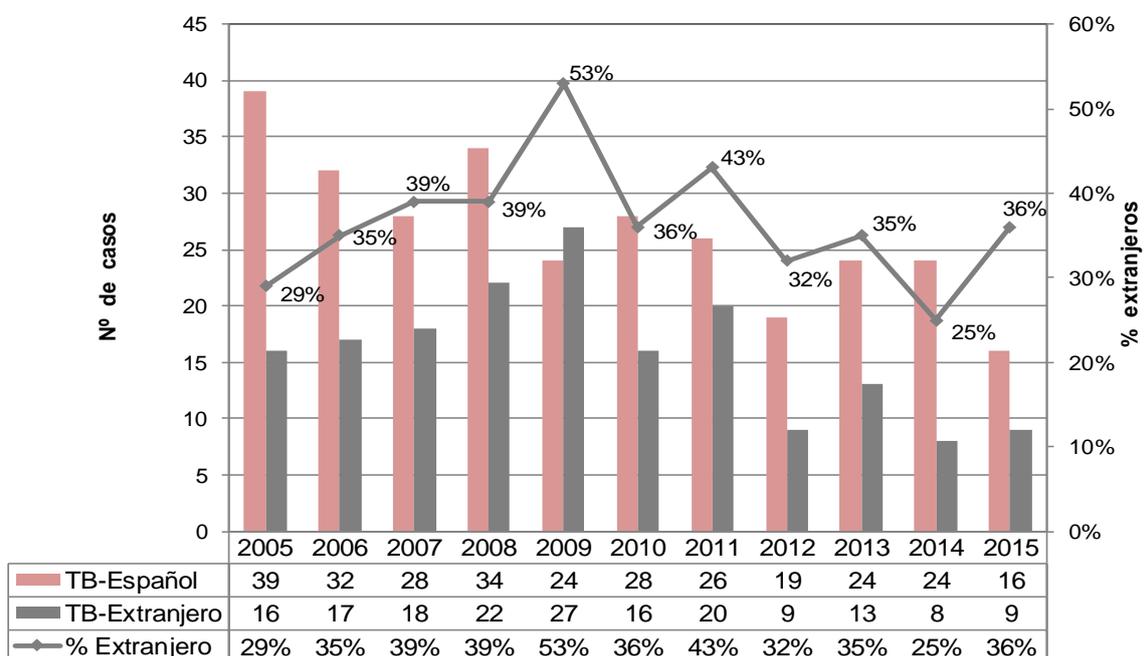
Los periodos de edad con mayor incidencia se mantuvieron al diferenciar por sexos, aunque el periodo de 35- 44 marco mucho mayor número de casos en hombres vs. mujeres a diferencia del de 25- 34 años y ≥ 65 años.

Figura 4.4.- Distribución de casos de TB por grupo de edad y sexo.

4.2.2.- Distribución de casos de TB según nacionalidad. Comparación con los datos de la Comunitat Valenciana.

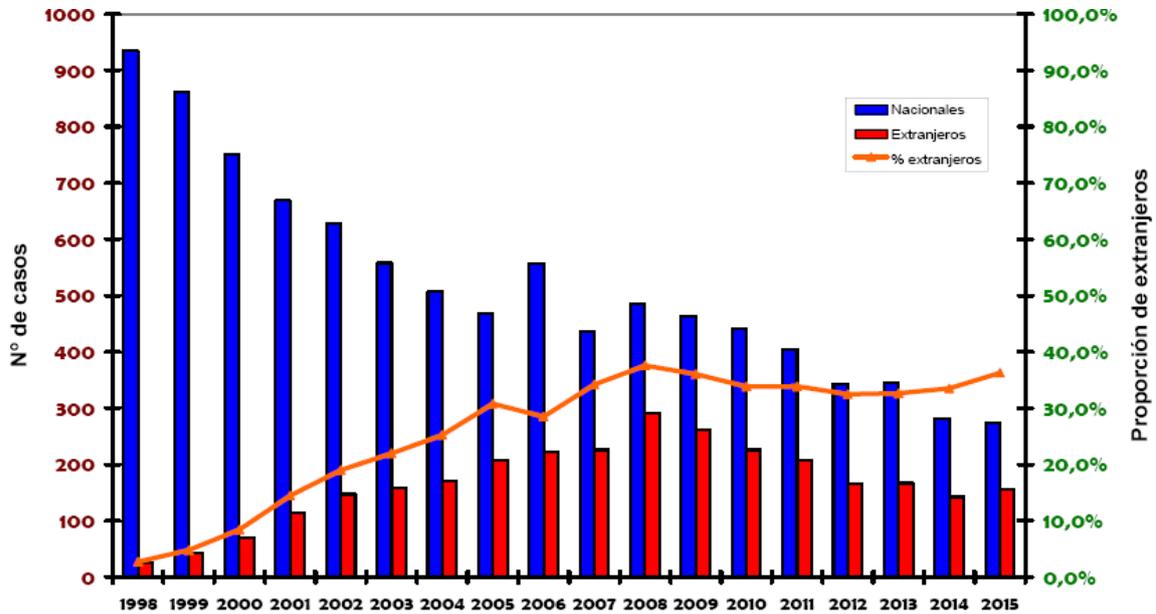
De los 469 casos de TB confirmada en nuestro Departamento de Salud, el 62,7% (294 casos) correspondieron a TB detectadas en españoles, siendo el 37,3% restante (175 casos) de personas extranjeras. No se pudo establecer en este estudio si se trataba o no de inmigración “reciente”. Esta mayor proporción de casos de TB entre españoles se mantuvo, excepto en 2009, a lo largo de todo el periodo 2005- 2015, aunque con diferencias a lo largo del estudio (Figura 4.5). Desde 2005 hasta 2009 los casos de TB en extranjeros fueron en aumento, pasando de 16 casos (29%) a 27 (53%). En este año 2009 los casos en españoles disminuyen llegando a ser los casos en extranjeros superiores (53%). Desde entonces los casos en extranjeros (32%) van disminuyendo.

Figura 4.5.- Casos de TB confirmada/ año según pacientes españoles/ extranjeros.



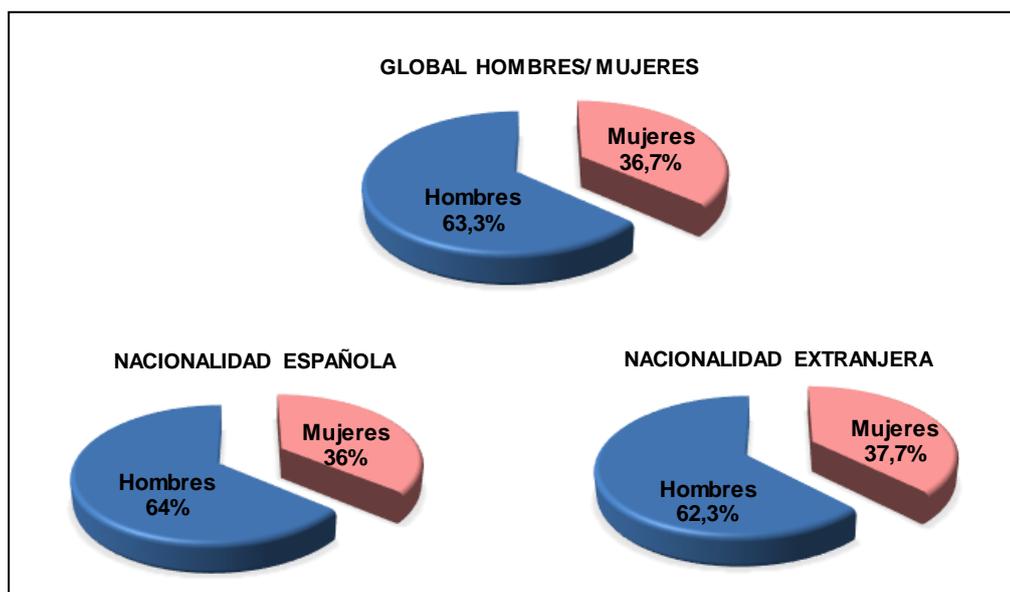
Los datos de Conselleria sobre casos de TB asociados a pacientes extranjeros con un periodo de residencia menor a 4 meses se muestra en la figura 4.6. Aunque aquí solo se considera caso en “extranjero” aquellos que ocurren en estos primeros 4 meses. En nuestro estudio no se contempla esta variable, al comparar datos se obtienen unas cifras muy similares, con tendencia desde el año 2008 al descenso hasta cifras iniciales. No se observaron, por tanto, diferencias en la asociación con TB a nacionalidad entre lo descrito en nuestro Departamento de Salud y al resto de la Comunitat Valenciana.

Figura 4.6.- Evolución de la TB desde el año 1998 al 2015 de los casos nacionales y extranjeros. Datos obtenidos del Informe de Salud- TB de la Conselleria de Sanitat en la Comunitat Valenciana ⁽¹⁷⁾.



Al analizar la variable sexo en TB según nacionalidad no se observaron diferencias ($p=0,803$) entre pacientes españoles y los casos extranjeros (Figura 4.7).

Figura 4.7.- Distribución de TB en hombre/ mujeres respecto al global, en nacionalidad española y extranjera por sexo.



La distribución según nacionalidad de los 175 casos en pacientes extranjeros se muestra en la tabla 4.2. Por continentes, América del sur (43%), seguido de África (28%), Europa (22%) y Asia (7%) fueron los lugares de procedencia más habituales de los extranjeros con TB. Por países fueron las zonas, de América del sur y zona central (Bolivia 46,7%) y noroccidental (Ecuador 28%). De los africanos la mayoría procedían de África del Norte (Marruecos 31,3%) y de la parte occidental (Malí y Senegal- 22,9% y 20,8% respectivamente). De Europa casi todos los pacientes extranjeros procedían de Europa del Este (Rumania 76,9%), mientras que de Asia provenían muy pocos casos (13) siendo los más abundantes procedentes de la zona sur (Pakistán 76,7%).

Tabla 4.2.- Lugar de origen de los pacientes extranjeros con TB (n= 175).

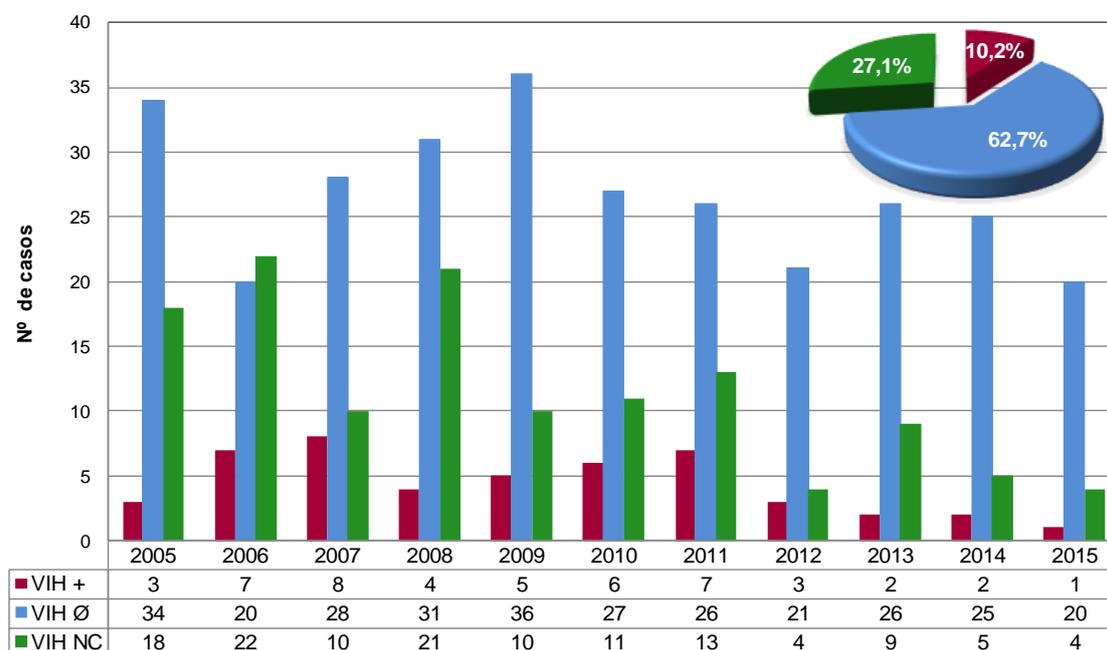
Continente (n / %)	País	Pacientes (n / %)	% Total extranjeros
Europa (39 / 22%)	Rumania	30 / 76,9	17,1
	Francia	4 / 10,3	2,3
	Ucrania	1 / 2,6	0,6
	Bulgaria	1 / 2,6	0,6
	Italia	1 / 2,6	0,6
	Portugal	1 / 2,6	0,6
	Polonia	1 / 2,6	0,6
América del Sur (75 / 43%)	Bolivia	35 / 46,7	20
	Ecuador	21 / 28	12
	Argentina	6 / 8	3,4
	Brasil	5 / 6,7	2,9
	Colombia	4 / 5,3	2,3
	Honduras	2 / 2,7	1,1
	Perú	1 / 1,3	0,6
	R. Dominicana	1 / 1,3	0,6
Asia (13 / 7%)	Pakistán	10 / 76,9	5,7
	India	1 / 7,7	0,6
	Afganistán	1 / 7,7	0,6
	China	1 / 7,7	0,6
África (48 / 28%)	Marruecos	15 / 31,3	8,6
	Mali	11 / 22,9	6,3
	Senegal	10 / 20,8	5,7
	Argelia	7 / 14,6	4
	Guinea Ecuatoriana	3 / 6,3	1,7
	Camerún	1 / 2,1	0,6
	Gambia	1 / 2,1	0,6

4.2.3.- Distribución de casos de TB con coinfección por VIH.

Tras búsqueda activa en los casos de TB a partir de los datos de la historia clínica informatizada y datos recopilados en el sistema informático del Servicio de Microbiología del Departamento de Salud Valencia- Dr. Peset respecto a la detección de Ag- Ac anti-VIH 1+2, se confirmaron 48 casos (10,2%) con coinfección por *M. tuberculosis* complex y VIH. El 62,7% (294 casos) fueron VIH negativo, mientras que en los 127 pacientes restantes (27,1%) no constaba petición ni resultado al respecto. De estos 48 casos VIH positivos, 30 fueron de nacionalidad española (62,5 %) y 18 extranjeros (37,5 %).

La distribución a lo largo de los once años de estudio de los casos con coinfección TB- VIH se muestra en la figura 4.8. Se observa como el número de positivos oscila entre 3 y 8 casos hasta el año 2012 y desciende a dos casos y a un solo caso en 2014 y 2015 respectivamente.

Figura 4.8.- Evolución por años de casos con coinfección TB- VIH confirmados en el Departamento de Salud Valencia- Dr. Peset.

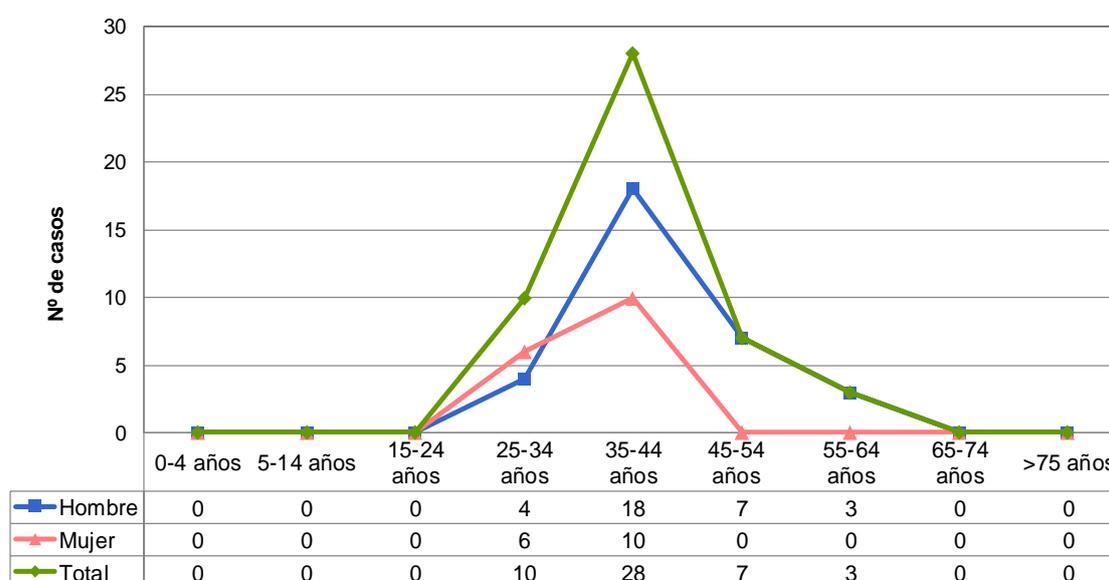


Los casos no analizados debido a que no constaba (NC) petición ni resultado al respecto, fueron más habituales en los primeros años de estudio, disminuyendo progresivamente hasta llegar a 4 de los 25 casos de TB en 2015. La distribución por

sexo de los 48 casos VIH positivos a lo largo del estudio fue de 32 hombres (66,7%) y 16 mujeres (33,3%), siguió una distribución similar a la de los casos totales de TB confirmadas en el estudio.

Si se analizan los datos de los TB- VIH por grupos de edad y sexo (Figura 4.9) se observa que tanto en hombres como en mujeres la edad en que más casos nuevos de TB y coinfección con VIH se detecta es en los grupos de 25- 34 años (con 4 casos en hombres y 6 en mujeres) y el de 35- 44 años (con 18 hombres y 10 mujeres), siguiendo una distribución bastante similar a los casos globales. El resto de TB- VIH aparecen en los grupos 45- 54 años (7 casos) y 55- 64 (3 casos restantes). No se detectaron casos de coinfección en edades inferiores a 24 años ni mayores de 65 años.

Figura 4.9.- Pacientes con coinfección TB- VIH. Distribución por grupo de edad y sexo.



4.2.4.- Localización pulmonar/ extrapulmonar de casos de TB.

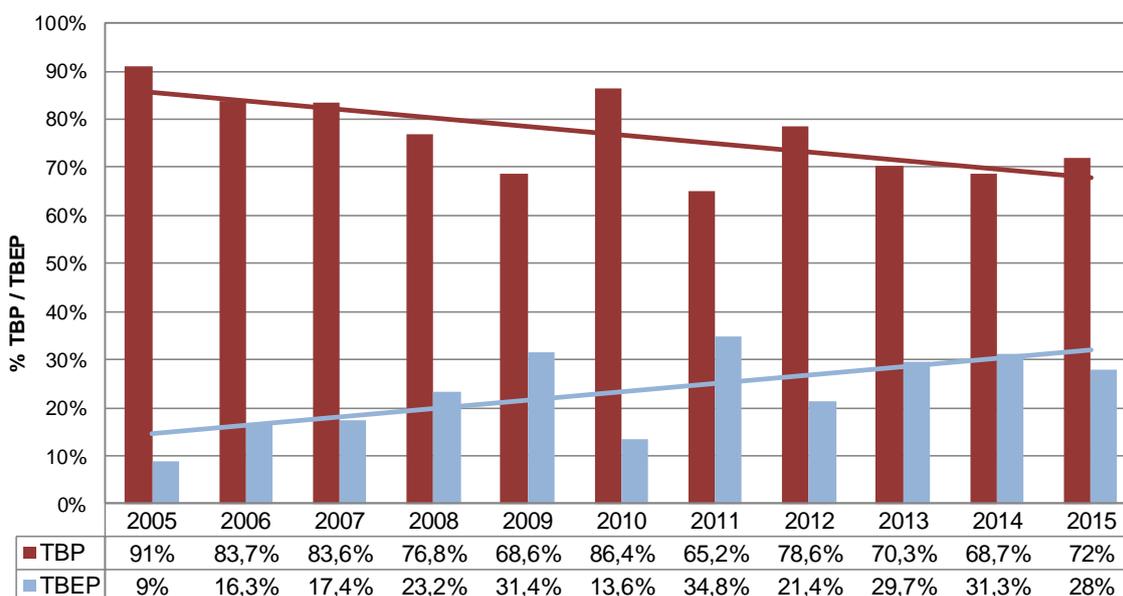
De las 469 TB diagnosticadas 363 (77,4%) fueron clasificadas como tuberculosis pulmonares (TBP), mientras que el 22,6% restante (106 casos) fueron de localización extrapulmonar (TBEP), donde están incluidos 35 casos de TB pleural, 37 etiquetadas clínicamente como diseminadas, 16 linfáticas, 8 osteoarticulares, 6 genitourinarias, 2 digestiva/ peritoneal y 2 como meningitis tuberculosa (Tabla 4.3).

Tabla 4.3.- Distribución de los casos de TB según localización pulmonar o extrapulmonar.

Localización	Número	Porcentaje
❖ Pulmonar	363	77,4%
❖ Extrapulmonar:	106	22,6%
Pleural	35	7,5%
Linfática Intratorácica	3	0,6%
Linfática Extratorácica	13	2,8%
Genitourinaria	6	1,3%
Ósteoarticular: Vertebral	6	1,3%
Ósteoarticular No Vertebral	2	0,4%
SNC	2	0,4%
Digestiva	1	0,2%
Peritoneal	1	0,2%
Diseminada Miliar	7	1,5%
Diseminada Extrapulmonar	9	1,9%
Diseminada Pulmonar + Extrapulmonar	21	4,5%

De las 16 tuberculosis linfáticas se diferenciaron 3 casos con afectación intratorácica y 13 con extratorácica; en las genitourinarias 3 casos fueron de foco genital, 2 con afectación en el riñón y el caso restante con daño en vejiga; en las ósteoarticulares se diferenciaron entre afectación vertebral (6 casos) o no vertebral (2 casos). De las 37 diagnosticadas como diseminadas 7 casos fueron miliares con afectación de pulmón, 9 casos con afectación de varias zonas, pero todas extrapulmonares y 21 casos donde estuvo afectado tanto el pulmón como partes extrapulmonares. Por ello, las tuberculosis con afectación de pulmón fueron 391 casos y las clasificadas estrictamente como pulmonares fueron 363 casos.

La distribución de los pacientes con TB en los distintos años según clasificación como pulmonar o extrapulmonar se refleja en la figura 4.10. La TB pulmonar pasa del 91% en 2005 al 72% en 2015. La TB extrapulmonar ha ido aumentando a lo largo del tiempo, pasando de menos del 10% de casos iniciales a cifras del 30% en los últimos años.

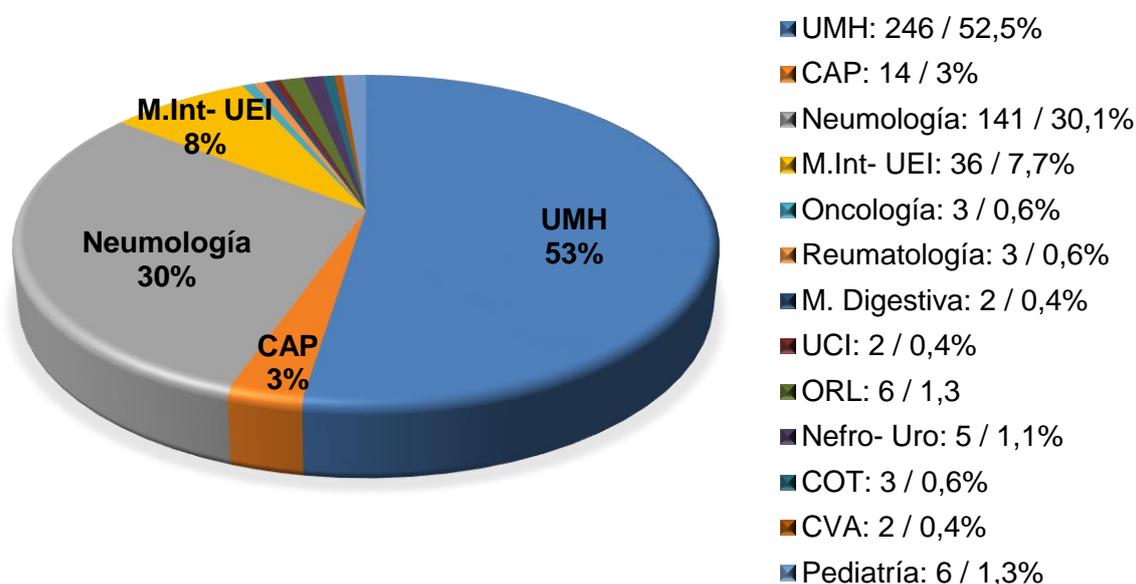
Figura 4.10.- Distribución por años de las TB pulmonares (TBP) y extrapulmonares (TBEP).

4.2.5.- Servicio de origen de casos con diagnóstico de TB confirmada.

La procedencia de la muestra a partir de la sospecha clínica (servicios peticionarios) se utilizó para establecer el origen o lugar de diagnóstico clínico-microbiológico de cada caso. Se diferenciaron en cuatro grupos: Servicio de Urgencias Médicas o desde Atención Primaria con 260 (56%) casos diagnosticados, Servicios Médicos con 187 (40%) casos, Servicios Quirúrgicos 13 casos (2,8%) y Pediatría con los 6 (1,3%) casos restantes.

En más de la mitad (52,5%) de las TB del Departamento de Salud Valencia- Dr. Peset el origen de las muestras fue el Servicio de Urgencias Médicas del Hospital (246 casos de los 469 detectados en el periodo de once años). El segundo lugar de origen correspondió al Servicio de Neumología (teniendo en cuenta consultas externas) con 141 casos (30,1%), seguido del Servicio de Medicina Interna, incluyendo la Unidad de Enfermedades Infecciosas, con 36 casos (7,7%). El resto de los servicios de origen, tanto Servicios Médicos, Servicios Quirúrgicos o incluso Centros de Atención Primaria representaron porcentajes mucho más bajos (Figura 4.11).

Figura 4.11.- Servicio de origen de los casos con diagnóstico de TB confirmada en el Servicio de Microbiología.



4.2.6.- Pacientes con más de un episodio de TB confirmado durante el estudio.

Entre los 469 pacientes con TB confirmada a lo largo de todo el periodo de estudio se describieron 14 casos que presentaron más de un episodio (casos clasificados como "SP"), tomando el criterio de diferencia de más de 12 meses entre fecha de los aislamientos, sus características se describen en la tabla 4.4. Excepto el caso SP07-12/05, con 7 episodios en 8 años, los 13 restantes presentaron solo dos episodios distintos. De estos 13, nueve de ellos lo fueron por cepas MTB sensibles, un caso mantuvo la resistencia a estreptomina en los dos episodios mientras que en 3 casos el segundo episodio se diagnosticó por PCR.

El paciente SP07-12/05 fue el único con episodios repetidos a lo largo de 8 años, tratándose de un paciente no cumplidor que finalmente negativizó en 2012. En este caso se trató de una cepa multirresistente que con el paso de los años pasó a ser una cepa pre- extremadamente resistente al adquirir resistencia a las fluoroquinolonas.

De los 14 casos en 4 pacientes la TB fue extrapulmonar en los dos episodios, siendo el resto TB pulmonares. Solo en tres pacientes se asociaron las recidivas a coinfección TB- VIH.

Tabla 4.4.- Casos de pacientes con más de un episodio de TB con aislamiento de MTB.

Paciente	Episodio/ Año	Tipo TB	VIH	BAAR	GX	Estudio de Sensibilidad
SP 11/ 09	2009	P	N	P (3+)	NC	Sensible
	2011	P	N	N	NC	Sensible
SP 12/ 08	2008	P	N	N	NC	Sensible
	2012	P	N	P (3+)	PM	Sensible
SP 12/ 09	2009	EP (Linfática)	N	N	NC	Sensible
	2012	EP (Linfática)	N	N	PM	Sensible
SP07-12/05	2005	P	N	N	NC	H H ₂ R
	2007	P	N	P (1+)	NC	H H ₂ R
	2009	P	N	P (2+)	NC	H H ₂ R E Z
	2010	P	N	P (1+)	PM	H H ₂ R E Z
	2011	P	N	P (2+)	NC	H H ₂ R E Z FQ
	2012	P	N	N	PL	H H ₂ R E Z FQ
SP 10/ 09	2009	P	P	P (1+)	NC	Sensible
	2010	P	P	N	PL	Sensible
SP 14/ 10	2010	EP (SNC)	P	N	PH	Sensible
	2014	EP (Linfática)	P	N	PVL	NC
SP 08/ 07	2007	P	N	P (2+)	NC	Sensible
	2008	P	N	P (4+)	NC	Sensible
SP 09/ 07	2007	P	N	N	NC	Sensible
	2009	P	N	P (2+)	NC	Sensible
SP 09/ 05	2005	P	N	P (2+)	NC	S
	2009	P	N	N	NC	S
SP 12/ 11	2011	EP (Genitourinaria)	N	N	PL	Sensible
	2012	EP (Genitourinaria)	N	P (4+)	PL	NC
SP 12/ 10	2010	EP (Linfática)	N	N	NC	Sensible
	2012	EP (Linfática)	N	N	NC	Sensible
SP 12/ 11	2011	P	N	P (4+)	PH	Sensible
	2012	P	N	P (1+)	PL	Sensible
SP 13/ 11	2011	P	P	P (4+)	PH	Sensible
	2013	P	P	P (1+)	PL	NC
SP 14/13	2013	P	N	P (4+)	PH	Sensible
	2014	P	N	P (3+)	PH	Sensible

TIPO TB: P: TB Pulmonar; EP: TB Extrapulmonar; VIH: P: Positivo; N: Negativo

GX: NC: no realizado; PL: Positive Low; PVL: Positive Very Low; PM: Positive Medium; PH: Positive High.

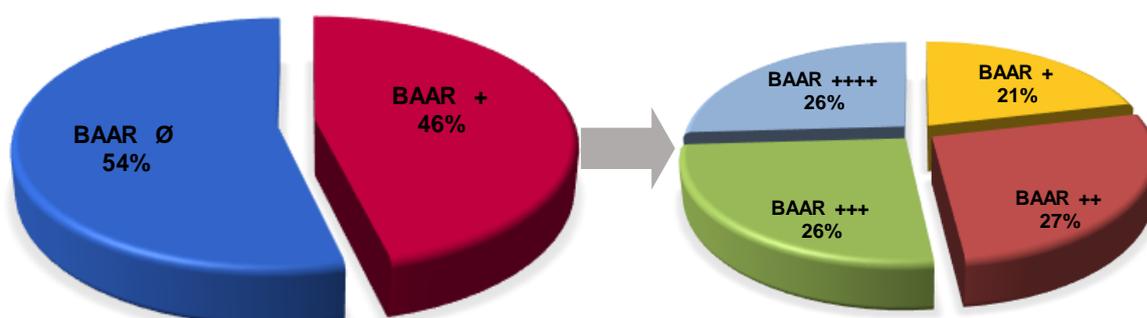
Sensibilidad: Cepa sensible a tuberculostáticos de primera línea (SHREZ), S (Estreptomina), H (Isoniacida), R (Rifampicina), E (Etambutol), Z (Pirazinamida) y FQ (Fluoroquinolonas).

4.3.- Aspectos microbiológicos de las TB confirmadas.

4.3.1.- Rentabilidad de la baciloscopia en el diagnóstico preliminar de TB.

Las baciloscopias iniciales sobre las muestras de los 469 pacientes con TB confirmada proporcionan un diagnóstico preliminar de “sospecha” de TB en 216 casos (46%) BAAR positivos, siendo los 253 casos restantes (54%) BAAR negativo. La cuantificación en cruces, de los casos positivos los clasificó en: 21% BAAR 1+ (46 casos); 27% BAAR 2+ (58 casos); 26% BAAR 3+ (56 casos) y 26% BAAR 4+ (56 casos) (Figura 4.12).

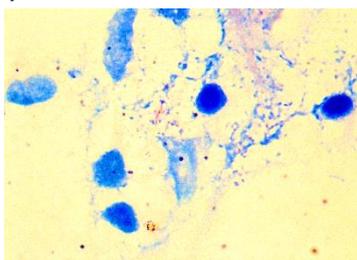
Figura 4.12.- Resultados globales de baciloscopia en los casos de TB y su cuantificación en cruces de las baciloscopias positivas.



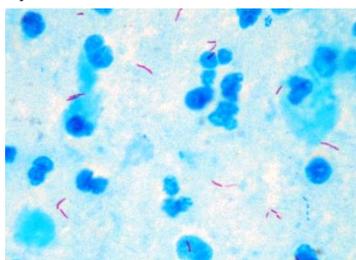
Algunos ejemplos donde se observa la baciloscopia semicuantitativa en cruces en cantidades diferentes de BAAR según los criterios descritos en el apartado de Material y Métodos se muestran en la figura 4.13.

Figura 4.13.- Ejemplos e interpretación de casos con distinto resultado en la baciloscopia semicuantitativa.

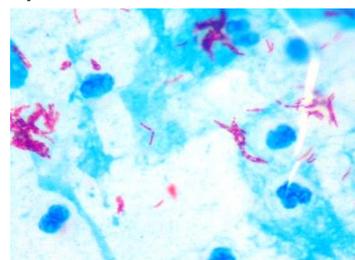
a) BAAR +



b) BAAR +++

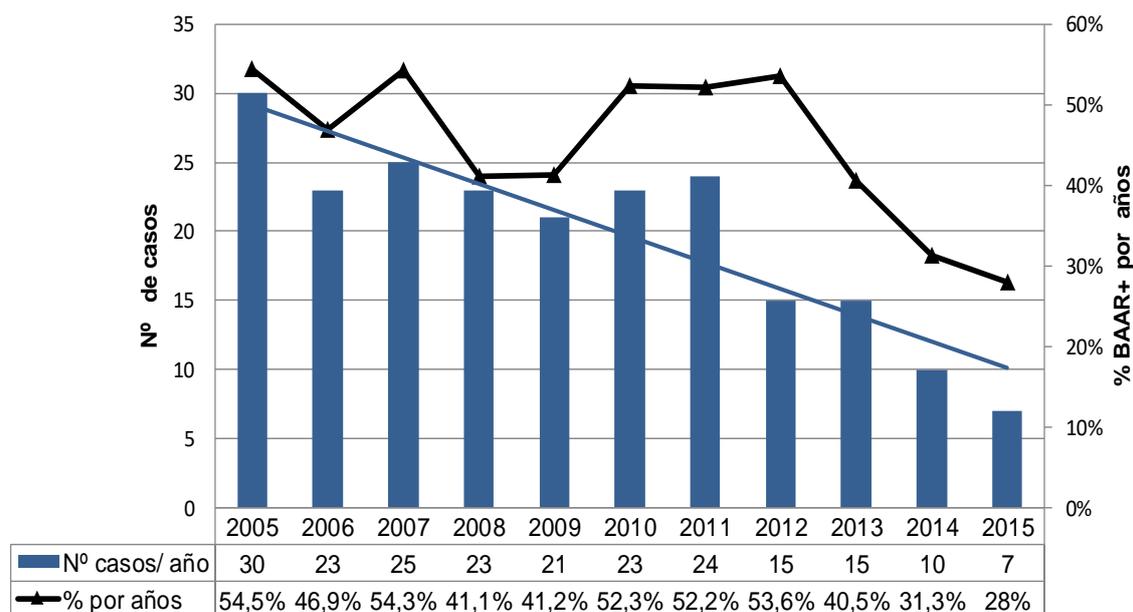


c) BAAR ++++



El dato global del 46,1% de baciloscopias positivas sobre el global de muestras (pulmonares y extrapulmonares) se analiza por años (Figura 4.14). En los primeros nueve años está entre el 54,5% en 2005 y el 40,5% del 2013, con línea de tendencia descendente. En los dos últimos años bajó a un 31,3% en 2014 y tan solo un 28% en 2015.

Figura 4.14.- Evolución de los casos de baciloscopias positivas y su porcentaje por años desde al año 2005 al 2015.



4.3.1.1.- Baciloscopia según localización pulmonar o extrapulmonar de la TB.

De las 363 TB pulmonares, en 200 casos la baciloscopia fue positiva (55,1%), mientras que este porcentaje disminuye al 15,1% (16 de 106) en los casos de TB extrapulmonares (Tabla 4.5). Se observan, por tanto, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) en la rentabilidad de la baciloscopia en el caso pulmonar vs. extrapulmonar

Tabla 4.5.- Rentabilidad de la baciloscopia en casos de TBP y TBEP.

TB	BAAR +/ n	% BAAR +
TBP	200 / 363	55,1%
TBEP	16 / 106	15,1%
Global	216 / 469	46,1

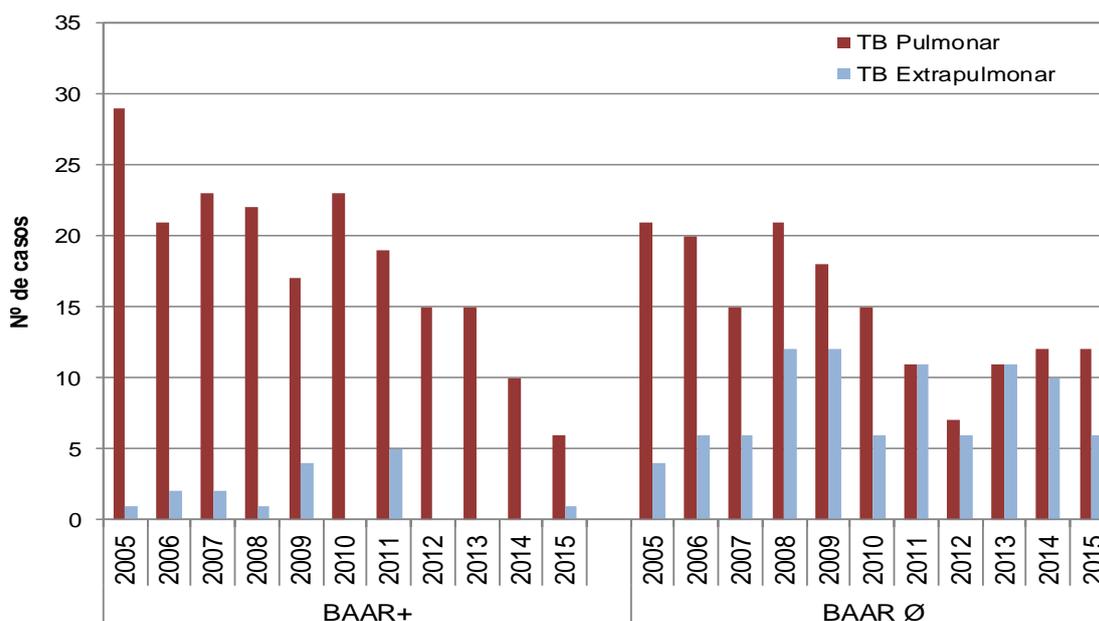
Según el tipo de muestras varían la rentabilidad de la baciloscopia, siendo un 60,3% la baciloscopia positiva en los esputos y de un 31,1% en los broncoaspirados (BAS), pasando a un 5,9% de baciloscopias positivas en biopsias de adenopatías o en punción aspiración en agua fina (PAAF) (Tabla 4.6).

Tabla 4.6.- Rentabilidad de la baciloscopia según el tipo de muestra.

Muestra	n	BAAR + (n / %)
Esputo	310	187 / 60,3%
BAS	74	23 / 31,1%
Líquido Pleural	26	1 / 3,8%
Biopsia Pleural	13	0 / 0%
B. adenopatía/ PAAF	17	1 / 5,9%
Orina	4	1 / 25%
Otros	25	3 / 12%

Los resultados de la baciloscopia positiva o negativa según localización pulmonar o extrapulmonar de cada caso distribuidos a lo largo de los años de estudio se muestran en la figura 4.15. De los casos con baciloscopia positiva (216 casos) el 92,6% (200 casos) correspondieron a TBP y solo el 7,4% a TBEP, cifras que se acercan en las baciloscopias negativas con 64,4% (163 casos) de TBP y 35,6% (90 casos) de TBEP.

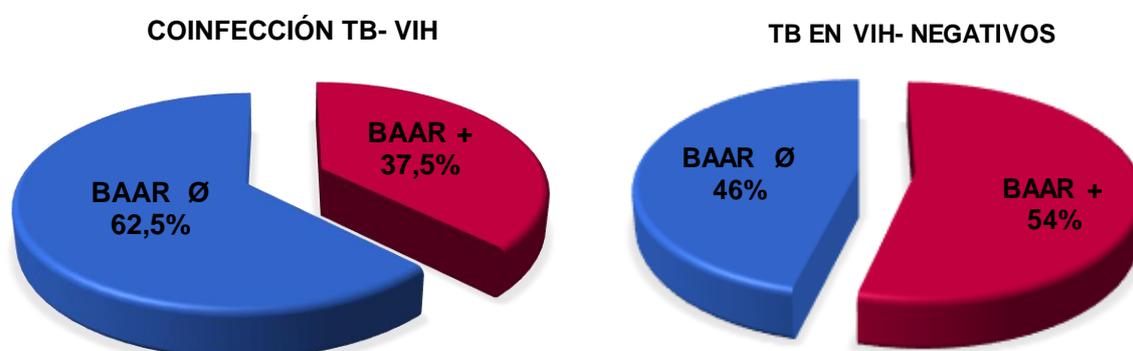
Figura 4.15.- Diferencias entre casos con baciloscopia positiva/ negativa y su localización.



4.3.1.2.- Baciloscopia en pacientes VIH.

En los pacientes con TB donde se pudo confirmar la coinfección por VIH (48 casos) la rentabilidad de la baciloscopia fue menor respecto al global de pacientes y respecto a los VIH como negativos. En este caso el 37,5% (18 casos) se diagnosticaron inicialmente por baciloscopia positiva, siendo los 30 restantes baciloscopia negativa (62,5%). Si se compara con el grupo de los 294 confirmados como VIH negativos se observan diferencias significativas ($p=0,019$) ya que en éstos el 54% (159) fueron BAAR positivos y 135 casos (46%) BAAR negativos (Figura 4.16).

Figura 4.16.- Rentabilidad de la baciloscopia en pacientes con coinfección TB- VIH y. pacientes con TB y VIH negativos.



4.3.2.- Aislamiento de MTB en medios de cultivo.

El aislamiento de MTB varía según si el tipo de muestra si es pulmonar y/ o extrapulmonar y el medio de cultivo líquido y/ o sólido en el que se ha detectado crecimiento. En todos los tipos de muestra el medio de cultivo sólido de LJ es más lento a la hora de observarse el crecimiento que en el medio de cultivo líquido de MGIT. En las muestras extrapulmonares el crecimiento es más tardío que en las muestras pulmonares.

En esputos en los medios de MGIT se observa crecimiento en una media de 12,08 días con un rango entre 5 y 52 días y en medios sólidos hay una media de 21,3 días con

un rango entre 13 y 45 días. En muestras extrapulmonares como en la orina la positividad en MGIT se da en una media de 22,5 días con un rango de 19 a 25 días y en los medios sólidos con una media de 30,75 días y un rango que oscila entre 28 y 34 días (Tabla 4.7).

Tabla 4.7.- Días de crecimiento según tipo de muestra y tipo de medio de cultivo. (Intervalo de confianza al 95%).

Muestra	n	Cultivo	Rango	Media	IC 95
Espuito	310	LJ	13 - 45	21,3	20,77 - 21,82
		MGIT	5 - 52	12,08	11,37 - 12,80
BAS	74	LJ	17 - 42	23,38	22,26 - 24,49
		MGIT	8 - 36	15,39	14,36 - 16,42
Líquido Pleural	26	LJ	17 - 55	27,27	24,45 - 30,08
		MGIT	10 - 24	18,85	17,24 - 20,45
Biopsia Pleural	13	LJ	23 - 34	28,15	26,17 - 30,14
		MGIT	12 - 26	20,92	18,71 - 23,14
B. Adenopatía/ PAAF	17	LJ	25 - 45	31,59	29,54 - 33,63
		MGIT	10 - 32	21,82	18,96 - 24,69
Orina	4	LJ	28 - 34	30,75	28,25 - 33,25
		MGIT	19 - 25	22,5	19,85 - 25,15
Otros	25	LJ	23 - 64	34,48	30,95 - 38,01
		MGIT	19 - 39	23,96	21,59 - 26,33

BAS: Broncoaspirado; B: Biopsia, PAAF: Punción Aspiración en Aguja Fina

En cuanto al tiempo de crecimiento de cultivo líquido MGIT, en todo tipo de muestras, el rango fue de 5 a 52 días con una media de 14,21 días (IC 95: 13,81 – 14,62), siendo 3 esputos más de 40 días de incubación en BACTEC MGIT 960. Cabe destacar que desde el inicio hasta el final del estudio los días de crecimiento casi no varían con los años, siendo en 2005 una media de 15,42 días de positividad y en 2015 una media de 14,16 días.

Respecto al tiempo de crecimiento en medio de cultivo sólido de LJ, tanto en muestras pulmonares como extrapulmonares el rango fue de 13 a 64 días (IC 95: 22,74– 23,58), donde hubo crecimiento en 14 casos en más de 40 días siendo: 5 esputos, 3 abscesos, 2 BAS, 1 biopsia de adenopatía, 1 PAAF, 1 líquido pleural y 1 biopsia pleural, al igual que pasaba con el medio líquido casi no ha habido variación con los años, teniendo una media de 24,11 días en 2005 y de 21,44 en el año 2015.

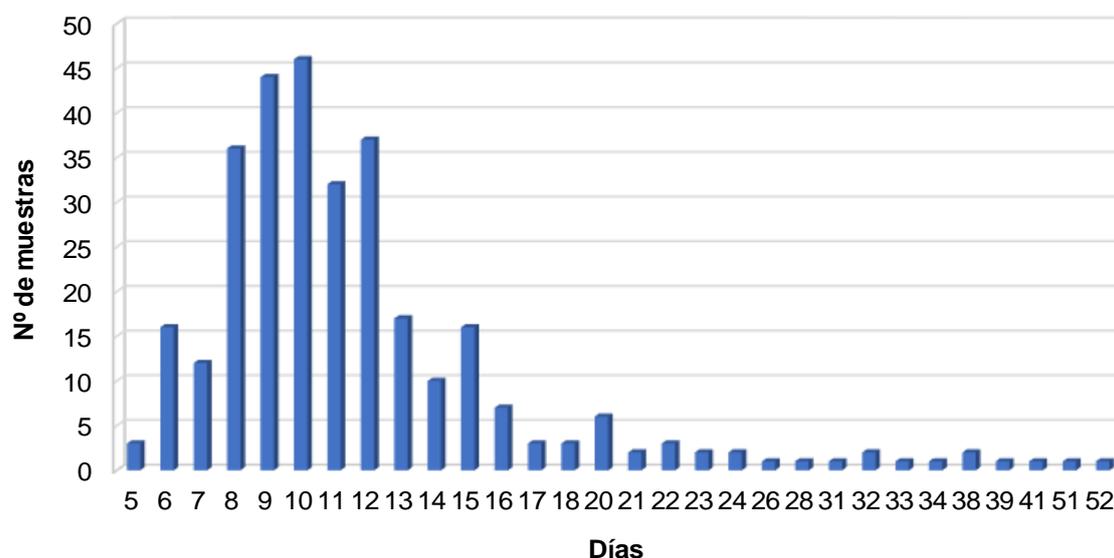
El tiempo de crecimiento de las muestras de esputo varía según si es baciloscopia positiva o negativa y además según el medio de cultivo, siendo de 19,35 días de media para baciloscopia positiva en medio sólido de LJ y de 9,45 días para MGIT. Sin embargo, en baciloscopia negativa aumentan los días para el medio de cultivo sólido pasa a ser una media de 24,26 días y de 16,06 días para MGIT (Tabla 4.8).

Tabla 4.8.- Tiempos de crecimiento de esputos según baciloscopia positiva o negativa y según el medio de cultivo.

Baciloscopia	Cultivo	Rango	Media	IC 95
BAAR +	LJ	13 - 25	19,35	19,02 – 19,68
	MGIT	5 - 33	9,45	9,06 – 9, 88
BAAR Ø	LJ	17 – 45	24,26	23,26 – 25,26
	MGIT	8 - 52	16,06	15,18 – 19,93

En las muestras de esputo se pudo observar un pico máximo de crecimiento en medio líquido a los 10 días de incubación, con 46 muestras positivas siendo muy pocos, tan sólo 3 los cultivos con crecimiento más allá de los 40 días (Figura 4.17).

Figura 4.17.- Tiempos de crecimiento en medio de cultivo líquido de MGIT para muestras de esputo.



4.3.3.- Identificación de especie/ cepa del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

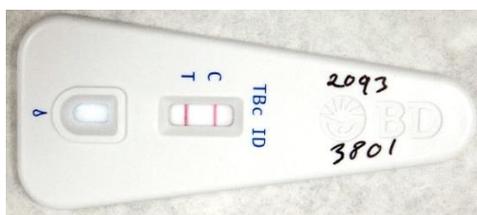
Aplicando la pauta de rutina del Servicio de Microbiología se identificaron como *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTB) todas las cepas aisladas de cada uno de los pacientes diagnosticados con TB. El primer paso ante la positividad del MGIT incubado en el sistema automatizado fue la confirmación de la presencia de BAAR tras tinción de Ziehl- Neelsen y observación al microscopio óptico de producción de “cord factor” (Figura 4.18).

Figura 4.18.- Tinción de Ziehl- Neelsen con “cord factor” positivo a partir de crecimientos en medio MGIT de cepas de MTB.



Una vez observada la presencia de BAAR en el cultivo (en MGIT y/ o en LJ) la identificación para confirmación de especie se realizó mediante sistema Accuprobe (GenProbe® BioMérieux) en los casos de los años 2005- 2009. A partir del año 2010 se procedió a aplicar una técnica de inmunocromatografía (IC) desde MGIT para detección de Ag secretado MPT64 que confirma *M. tuberculosis* complex en 15 minutos con la presencia de una banda colorimétrica (Figura 4.19).

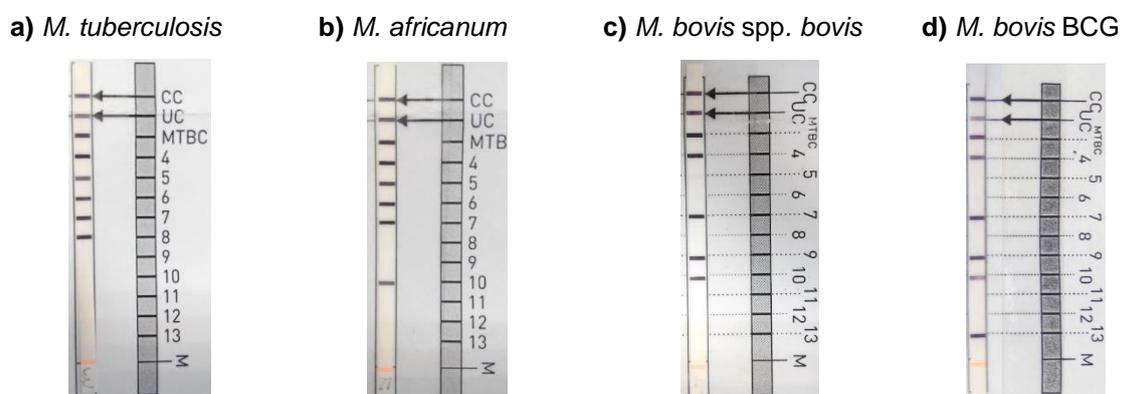
Figura 4.19.- Identificación de *M. tuberculosis* complex mediante inmunocromatografía (TBc IC- BD®).



La identificación de especie dentro del “complejo tuberculosis” se realizó de forma seleccionada sobre 55 aislados, descongelando las cepas mantenidas desde el

año 2005 y aplicando una técnica de PCR hibridación reversa (GenoType MTBC- HAIN LifeScience®). Los criterios de selección fueron: i) cepas congeladas y viables con resistencia a pirazinamida, tanto con resistencia aislada como o asociada con algún otro fármaco; y ii) cepas congeladas y viables de pacientes con origen africano. De estas 55 cepas analizadas se pudo confirmar el aislamiento de tres casos de *Mycobacterium africanum*, un caso de *Mycobacterium bovis subespecie bovis* y un caso de *Mycobacterium bovis* BCG, siendo los 50 casos restantes *M. tuberculosis* (Figura 4.20).

Figura 4.20.- Ejemplos de perfiles para identificación de distintas especies dentro del complejo *M. tuberculosis* mediante GenoType MTBC- HAIN LifeScience®.



4.4.- Estudio de sensibilidad de los aislados de MTB a tuberculostáticos.

4.4.1.- Estudio de sensibilidad mediante sistema automatizado BACTEC MGIT 960 para SIRE- Pirazinamida.

Se realizó el estudio de sensibilidad frente a los 5 tuberculostáticos de primera línea mediante sistema automatizado BACTEC MGIT 960 BD® a un total de 649 aislados de MTB incluyendo al menos una cepa de cada uno de los 469 casos diagnosticados con TB a lo largo del periodo de estudio.

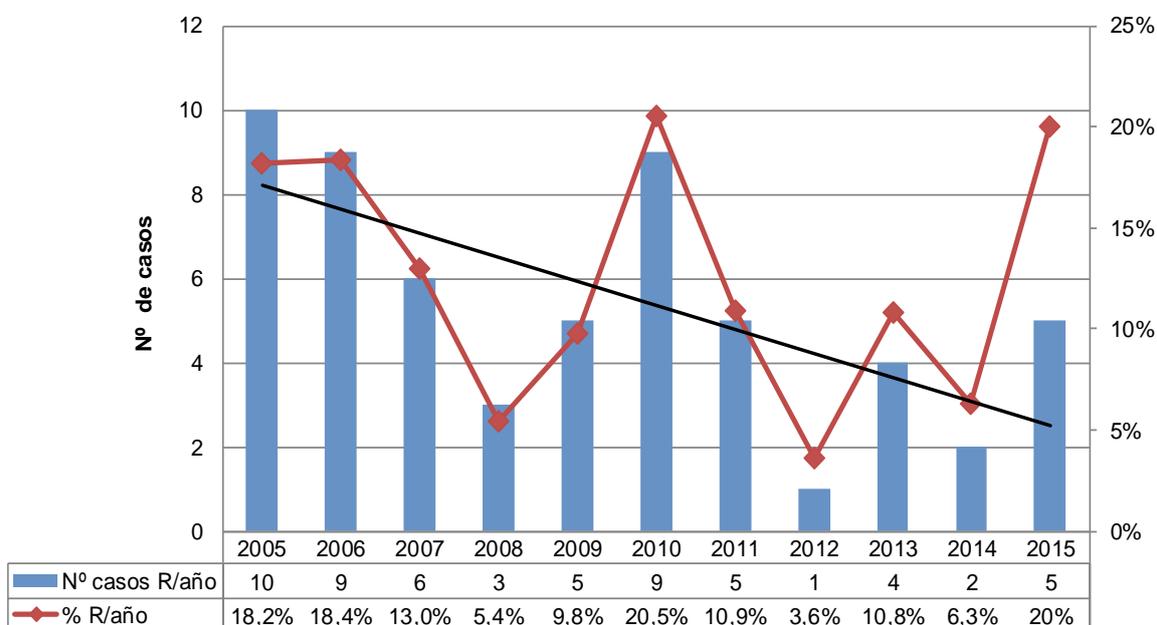
Se realizó, por tanto, en algunos casos más de un antibiograma, siguiendo criterios de control de nuevos episodios (casos "SA" o "SP") o control tras la no negativización del cultivo (cultivo positivo tras 2- 3 meses de tratamiento), estudiando

así posibles apariciones de resistencias secundarias. De los 649 aislados de MTB fueron 180 casos en los que se realizó más de un ATB. El resultado (sensible o resistente) no se modificó con el tiempo ni con las distintas cepas, excepto en un caso correspondiente a un paciente MDR-TB, que se fue modificando a lo largo de los 8 años de episodio, adquiriendo resistencias secundarias hasta que finalmente llegó a negativizar.

4.4.1.1.- Resistencias globales a uno o varios fármacos.

El número de casos de TB con cepas resistentes a 1 o más fármacos de primera línea a lo largo del estudio fue de 59 (12,6%). En su evolución por años (Figura 4. 21) se observó una disminución progresiva del número de casos/ cepas resistentes (tal como muestra la curva de tendencia) pasando de 10 casos (18,2%) en 2005 a 2 casos (6,3%) en 2014, con un pico en el año 2010 (9 casos- 20,5%) y un pico final en el último año estudiado (5 casos- 20%).

Figura 4.21.- Distribución y tendencia por años de los casos de TB con resistencia a tuberculostáticos.



En la tabla 4.9 se pueden observar los casos de resistencia detalladas por años, bien a un solo fármaco (S, H, R, E, Z) con 41 casos o a combinaciones de los mismos siendo 18 casos, de los que 9 correspondieron con resistencia a H y R (cepas MDR-TB).

Tabla 4.9.- Descripción de resistencias detalladas a lo largo del estudio.

AÑO/ATB	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	TOTAL
S	2	2	4	3	1	5	3	-	2	1	2	25
H	3	3	1	-	1	3	1	-	1	-	-	13
R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Z	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1	3
SE	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
SH	1	1	-	-	2	-	-	-	-	-	-	4
SZ	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
HE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
HR	1	1	-	-	-	1	-	1	-	-	-	4
SEZ	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
SHE	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
SHR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
SHRZ	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2
SHREZ	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	2
TOTAL	10	9	6	3	5	9	5	1	4	2	5	59

S: estreptomina; H: isoniacida; R: rifampicina; E: etambutol; Z: pirazinamida.

Para la descripción y análisis de estas resistencias se agruparon en resistencias a 1, 2 o más fármacos, analizando de forma más concreta aquellas correspondientes a cepas MDR-TB, con resistencia a isoniacida (H) y rifampicina (R).

a) Resistencias aisladas a un solo fármaco.

Las cepas con solo un fármaco de primera línea resistente fueron 41. En 25 casos (5,3%) se detectó resistencia aislada fenotípica a estreptomina (S). Esta resistencia “in vitro” a concentración baja no siempre fue reproducible. En 13 casos (2,8%) se detectó resistencia aislada a isoniacida (H) y en 3 resistencia aislada a pirazinamida (Z). No se detectó ninguna resistencia aislada a rifampicina ni etambutol estando siempre asociadas al menos a resistencia con otros fármacos (Tabla 4.10). Los 18 casos restantes fueron resistencias asociadas a dos o más fármacos.

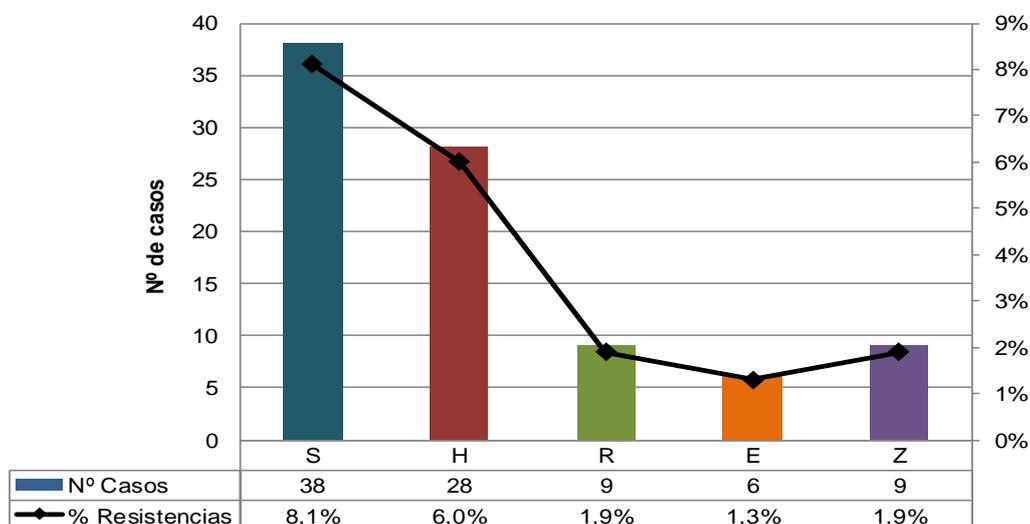
Tabla 4.10.- Resistencias globales a un solo fármaco (n= 41) por sistema SIRE- P BACTEC MGIT 960 en los aislados de los 469 casos estudiados.

ATB	Nº Resistencias	% sobre total n= 469
S	25	5,3
H	13	2,8
R	0	0,0
E	0	0,0
Z	3	0,6

b) Resistencia a cada fármaco (de forma aislada o combinada).

Sumando tanto las resistencias a un solo fármaco como las posibles distintas combinaciones se describieron un total de 90 casos. Estos se distribuyen de la siguiente forma (Figura 4.22): a isoniacida: 28 casos (6%); rifampicina: 9 casos (1,9%); etambutol: 6 casos (1,3%); y pirazinamida: 9 casos (1,9%), siendo 38 aislados resistentes a estreptomicina (8,1%). No se pudo diferenciar entre resistencias primarias o secundarias al no disponer de los datos precisos para su distinción.

Figura 4.22.- Resistencias globales (n= 90) a los tuberculostáticos en los 469 casos estudiados.

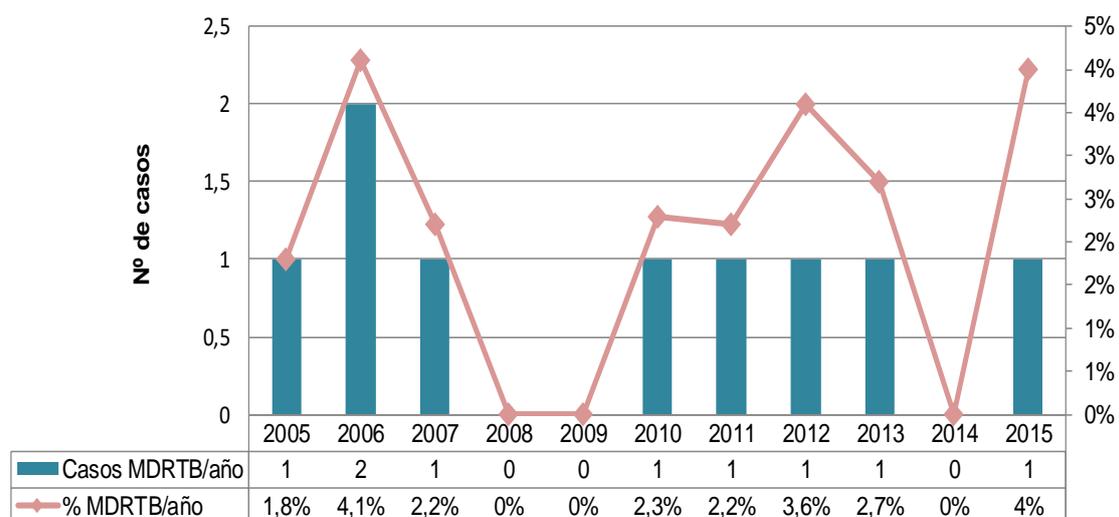


4.4.1.2.- Estudio de cepas multirresistentes a lo largo de los años de estudio.

Los casos asociados a multirresistencia (MDR-TB) representaron el 1,9% (9 casos) entre los pacientes del estudio. Al estudiar la evolución por años estas cepas

MDR-TB se observó que excepto en 2006, con 2 casos, el resto de años sólo se detectó 1 caso y no se detectaron multirresistencias en los años 2008, 2009 y 2014. Así el porcentaje de MDR osciló entre el 0% de estos años y el 4%- 4,1% de 2015 y 2006 respectivamente como se representa en la figura 4.23. De los casos MDR-TB, 4 fueron resistentes a HR, 2 a SHRZ, 2 a SHREZ y sólo uno a SHR, distribuidos por igual a lo largo de los años.

Figura 4.23.- Distribución por años de los casos de MDR-TB a lo largo del estudio.



Si estudiamos todas las cepas multirresistentes obtenidos a lo largo del periodo de estudio se detectaron 17 casos, nueve cepas pertenecen a pacientes diferentes teniendo un solo episodio y las 8 cepas restantes son de un mismo paciente que ha tenido varios episodios a lo largo de los años, siendo la primera cepa MDR-TB en el año 2005 siendo resistente a IR, teniendo luego nuevos episodios en 2007, 2009, 2010, 2011 y 2012, donde adquiere nuevas resistencias y pasa también a ser resistente a etambutol y pirazinamida (HREZ) hasta que finalmente negativiza en 2012.

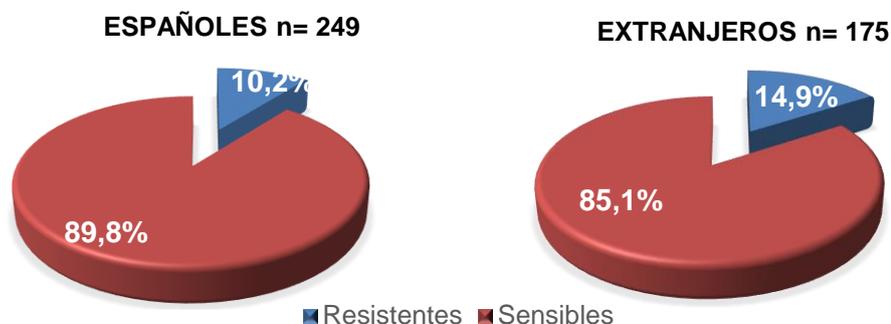
4.4.1.3.- Resistencias según variable demográfica del paciente.

La distribución cepas/ casos resistentes según nacionalidad, sexo o según coinfección TB- VIH se muestra en la figura 4.24. Entre los 59 casos de cepas con algún

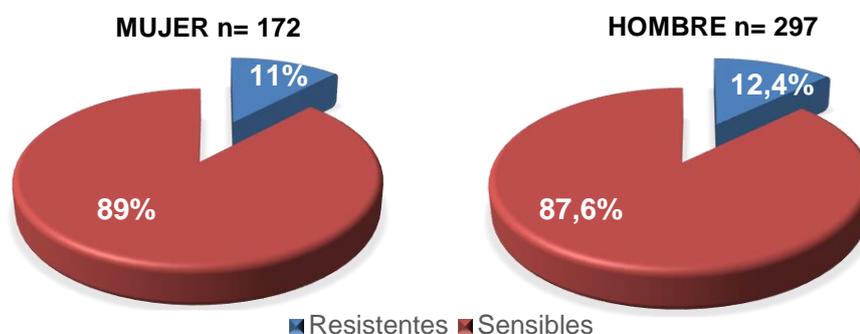
tipo de resistencia no se detectaron diferencias significativas ($p= 0.184$) entre resistencias en casos de españoles (30 casos- 10,2%) y de extranjeros (26 casos- 14,9%). La diferencia de porcentajes de resistencias por sexo sigue la distribución similar a la totalidad de los casos (37 casos en hombres con resistencia con un 12,4% y 11% en mujeres, con 19 casos) ($p= 0,685$). Entre los TB- VIH solo 5 de los 48 pacientes presentaron resistencia a algún fármaco representando el 10,4%, describiéndose sólo un caso MDR-TB entre ellos. No se detectaron diferencias significativas ($p=0,493$) entre resistencias globales en VIH positivos y en el resto de casos estudiados.

Figura 4.24.- Distribución de casos con cepas sensibles o resistentes frente a tuberculostáticos de primera línea según variable demográfica analizada.

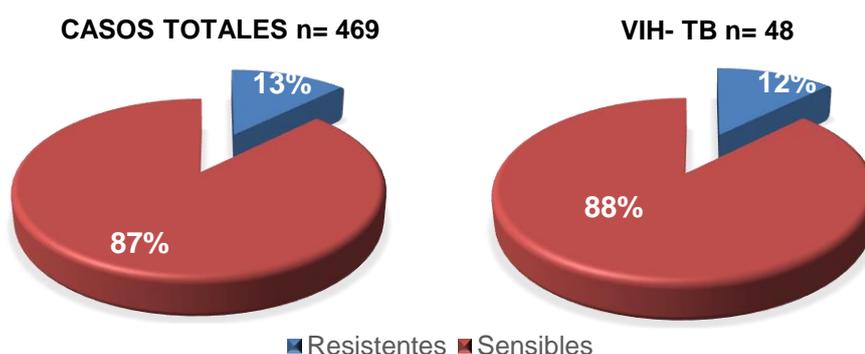
a) Nacionalidad



b) Sexo



c) Coinfección TB- VIH



4.4.2.- Estudio de resistencias mediante métodos genotípicos convencionales.

4.4.2.1.- Detección de resistencias a rifampicina y/ o isoniacida mediante el GenoType MTBDRplus®.

De las 28 cepas con resistencia a isoniacida se pudieron recuperar 23 para aplicación de métodos moleculares genotípicos convencionales para la detección de resistencia a rifampicina y/ o isoniacida mediante el GenoType MTBDRplus®.

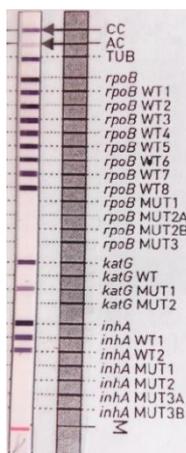
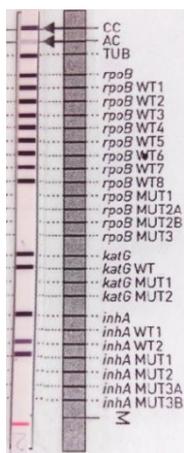
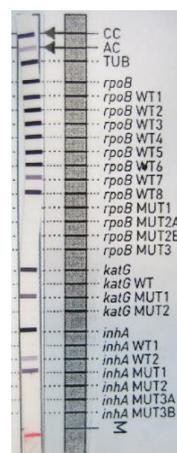
De los 23 casos estudiados se detectaron: i) 9 cepas con resistencia a isoniacida y rifampicina, 6 de ellas con mutación en el gen *rpoB* y *katG* y las otras 3 con mutación en el gen *rpoB* e *inhA*; ii) 13 casos con resistencia sólo a isoniacida de las que 9 presentaron resistencia de alto nivel (mutación en el gen *katG*) y 3 resistencia de bajo nivel (mutación en el promotor *inhA*), detectando en el caso restante mutación en los genes *katG* e *inhA*. Los distintos patrones de bandas según las mutaciones se muestran en la figura 4.25.

Figura 4.25.- Patrones de bandas de cepas confirmadas con resistencia a rifampicina y/ o isoniacida mediante el GenoType MTBDRplus®.

a) *rpoB* WT8, MUT3/ *KatG* WT, MUT1

b) *rpoB* WT3, WT4, MUT1/ *inhA* WT1, MUT1



c) *KatG* WT, MUT1d) *inhA* WT1, MUT1e) *katG* WT, MUT1/ *inhA* WT1, MUT1

Los resultados obtenidos para la detección de mutaciones en *rpoB*, *katG* y/ o *inhA* mediante MTBD*plus* (HAIN LifeScience®) para confirmación de resistencia a isoniacida y rifampicina fueron: i) para cepas resistentes a rifampicina: el patrón mayoritario con 4 casos fue ausencia de banda “Wild type 8” donde el codón analizado es el 530- 533 y presencia de banda en la mutación MUT3 (S531L) en *rpoB* y en el gen *katG* ausencia de banda en “Wild type” donde el codón analizado es el 315 y presencia de banda de mutación en MUT1 (S315T1), los otros patrones de banda con resistencia en *rpoB* y *katG* solo aparecieron una vez; ii) de las cepas resistentes a isoniacida: de alto nivel el patrón mayoritario fue ausencia de banda en “Wild type” donde el codón analizado es el 315 y presencia de banda de mutación en MUT1 (S315T1) apareciendo este en 7 casos, un caso fue con ausencia de banda “Wild type” y mutación en MUT2 (S315T2). En las cepas resistentes a isoniacida de bajo nivel el patrón mayoritario fue ausencia de banda “Wild type 1” donde el ácido nucleico analizado está en la posición -15 y la presencia de banda de mutación en *inhA* MUT1 que corresponden a la mutación C15T. Detectamos un caso en que fue resistente tanto a isoniacida de bajo como alto nivel y un caso donde sólo aparecía la mutación por la ausencia del “Wild type”.

Se detectó un caso en el que apareció resistencia a isoniacida y etambutol en el sistema BACTEC MGIT 960 pero no se pudo confirmar la resistencia a isoniacida por el método molecular de PCR- hibridación reversa. Una posible explicación sería que los kits comerciales están diseñados para detectar las mutaciones más habituales y fijadas en la población. En la tabla 4.11 están descritos todos los patrones de bandas obtenidos con el MTBDR*plus* (HAIN LifeScience®).

Tabla 4.11.- Patrones de todas las cepas resistentes a rifampicina y/ o isoniacida confirmadas por métodos genotípicos convencionales (GenoType MTBDRplus®).

Caso	Año	ATB	MTBDRplus
MDR_01_2006	2006	H R	HR (<i>rpoB</i> WT3, WT4, MUT1/ <i>inhA</i> WT1, MUT1)
MDR_02_2006	2006	S S ₂ H H ₂ R Z	HR (<i>rpoB</i> WT8, MUT3/ <i>KatG</i> WT, MUT1)
MDR_03_2007	2007	S S ₂ H H ₂ R Z	HR (<i>rpoB</i> WT8, MUT3/ <i>katG</i> WT, MUT1)
MDR_04_2010	2010	H H ₂ R	HR (<i>rpoB</i> MUT3/ <i>KatG</i> MUT1)
MDR_05_2011	2011	S H H ₂ R EE ₂ Z	HR (<i>rpoB</i> WT8, MUT3/ <i>KatG</i> WT, MUT1)
MDR_06_2012	2012	H H ₂ R	HR (<i>rpoB</i> WT8, MUT3/ <i>KatG</i> WT, MUT1)
MDR_07_2013	2013	S S ₂ H H ₂ RE Z	HR (<i>rpoB</i> WT2, WT3/ <i>katG</i> WT, MUT1)
MDR_08_2015	2015	S H R	HR (<i>rpoB</i> WT8, MUT2A, MUT3/ <i>inhA</i> MUT1)
MDR_09_2007	2007	H H ₂ R	HR (<i>rpoB</i> MUT2A/ <i>inhA</i> MUT1)
R_01_2005	2005	S H	H (<i>KatG</i> WT, MUT1)
R_02_2005	2005	H H ₂	H (<i>KatG</i> WT, MUT1)
R_03_2005	2005	H H ₂	H (<i>KatG</i> WT, MUT1)
R_04_2005	2005	H H ₂	H (<i>KatG</i> WT, MUT1)
R_05_2006	2006	H H ₂	H (<i>KatG</i> WT, MUT1)
R_06_2006	2006	H	H (<i>inhA</i> WT1, MUT1)
R_07_2006	2006	S S ₂ H	H (<i>inhA</i> WT1, MUT1)
R_08_2006	2006	S S ₂ H H ₂ E	H (<i>katG</i> WT, MUT1/ <i>inhA</i> WT1, MUT1)
R_09_2009	2009	S S ₂ H H ₂	H (<i>KatG</i> WT, MUT1)
R_10_2010	2010	H H ₂	H (<i>KatG</i> WT, MUT2)
R_11_2010	2010	H	H (<i>inhA</i> WT1, MUT1)
R_12_2011	2011	H H ₂	H (<i>KatG</i> WT, MUT1)
R_13_2013	2013	H H ₂	H (<i>KatG</i> Control, WT)
R_14_2015	2015	H E	SENSIBLE

4.4.2.2- Resistencias a etambutol y/ o fármacos de segunda línea mediante el GenoType MTBDRs/ V.1.0.

De las 59 cepas resistentes a algún fármaco se obtuvieron 6 resistentes a etambutol detectándose mediante el BACTEC MGIT 960, todas ellas asociadas con otros fármacos. Las 2 cepas con resistencia a SE y SEZ no se pudieron recuperar para el estudio genotípico y las 4 cepas recuperadas resistentes fenotípicamente a etambutol están asociadas isoniacida.

El estudio mediante GenoType MTBDRs/ V.1.0, para mutaciones que codifican resistencia a fluoroquinolonas, aminoglicósidos/ péptidos cíclicos y etambutol se realizó

sobre las 23 cepas estudiadas con el GenoType MTBDR*plus*, (incluidas las cepas recuperadas resistentes a etambutol). Se detectaron con el estudio genotípico 3 cepas resistentes a etambutol, cada una con un patrón de bandas diferente y dos cepas sensibles (sin mutación). La cepa (MDR_04_2010), que no presentaba resistencia fenotípica a etambutol, tras PCR- hibridación reversa se detectó una mutación en el gen *embB*. (Tabla 4.12).

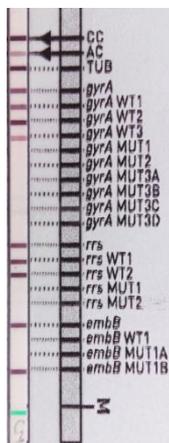
Tabla 4.12- Patrones de todas las cepas resistentes a rifampicina y/o isoniacida y etambutol confirmadas por métodos genotípicos convencionales (GenoType MTBDR*s*/ V.1.0).

Caso	Año	ATB	MTBDR <i>s</i> / V.1.0
R_08_2006	2006	S S ₂ H H ₂ E	E (<i>embB</i> WT1, MUT1A)
R_14_2015	2015	H E	SENSIBLE
MDR_04_2010	2010	H H ₂ R	E (<i>embB</i> MUT1A)
MDR_05_2011	2011	S H H ₂ R E E ₂ Z	SENSIBLE
MDR_07_2013	2013	S S ₂ H H ₂ R E Z	E (<i>embB</i> WT1, MUT1B)

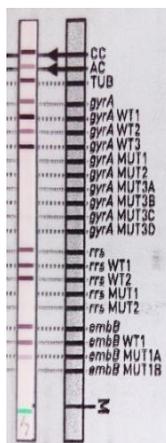
Los patrones de bandas obtenidos de cada cepa resistente a etambutol fueron diferentes. En la figura 4.26 se pueden observar los tres patrones distintos obtenidos. La mutación en el gen *embB* con ausencia de banda WT1 y presencia de banda MUT1B corresponde a la posición M306V; el otro patrón con ausencia de banda WT1 y presencia de banda en MUT1A corresponde a la posición M306I y el otro patrón obtenido no tiene ausencia de banda WT pero al tener la mutación MUT1A también corresponde a la posición M306I (Figura 4.26).

Figura 4.26.- Patrón de bandas de cepas confirmadas con resistencia a etambutol mediante el GenoType MTBDR*s*/V.1.0.

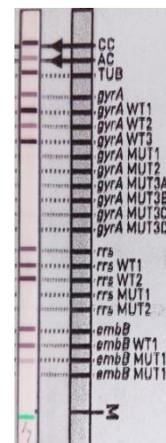
a) *embB* WT1 + MUT1B



b) *embB* MUT1A



c) *embB* WT1 + MUT1A

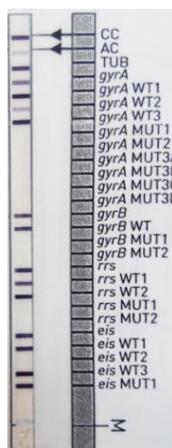


4.4.2.3.- Resistencias a fármacos de segunda línea mediante el GenoType MTBDRs/V.2.0.

A estas 23 cepas MDR-TB se les realizó también el estudio genotípico convencional para la detección de resistencias a fármacos de segunda línea, en concreto a aminoglicósidos y peptídos cíclicos mediante GenoType MTBDRs/V.2.0. De todas ellas sólo en una cepa se detectó resistente a kanamicina de bajo nivel, siendo el patrón de bandas: ausencia de banda en “Wild type 2” y presencia de banda en la mutación MUT1 en el gen *eis*, correspondiente a la posición C-14T (Figura 4.27).

Figura 4.27.- Patrón de bandas de cepas confirmadas con resistencia a kanamicina mediante el GenoType MTBDRs/V.2.0.

a) *eis* WT2, MUT1



4.4.3.- Características demográficas y microbiológicas de los pacientes MDR-TB.

Los datos de los 9 casos MDR-TB detectados a lo largo del estudio se muestra en la tabla 4.13. Correspondieron mayoritariamente a hombres (la relación Hombre/Mujer es 7:2). Cinco pacientes eran de nacionalidad española y tan solo uno era VIH positivo. La mayoría fueron casos de tuberculosis pulmonar. La prueba del GeneXpert se realizó a 4 casos (a partir del año 2010) que fueron positivos para la detección de *M. tuberculosis* y detección de resistencia a rifampicina por la mutación en el gen *rpoB*.

Tabla 4.13.- Características demográficas y microbiológicas de los pacientes MDR-TB.

NOMBRE	SEX	EDAD	ORIGEN	VIH	BK	MUESTRA	TB	ATB	GX/RIFA
MDR_01_2006	H	68	España	N	0	BAS	P	HR	NC
MDR_02_2006	H	37	España	N	1	Esputo	P	SS ₂ HH ₂ RZ	NC
MDR_03_2007.	M	30	España	N	3	Esputo	P	SS ₂ HH ₂ RZ	NC
MDR_04_2010	H	48	España	N	3	Esputo	P	H H ₂ R	PVL/ P
MDR_05_2011	H	28	China	N	4	Esputo	P	SHH ₂ REE ₂ Z	PL/ P
MDR_06_2012	H	26	Bolivia	N	0	Esputo	P	H H ₂ R	PVL/ P
MDR_07_2013	M	45	Rumania	N	0	L.Pleural	EP	SS ₂ HH ₂ REZ	NC
MDR_08_2015	H	43	Rumania	P	4	Esputo	EP	SHR	PH/ P
MDR_09_2007*	H	33	España	N	1	Esputo	P	H H ₂ R	NC

SEX: sexo, H: Hombre, M: Mujer, N: Negativo, P: Positivo, BK: Baciloscopia, NC: No realizado, PVL: Very Low, PL: Low, PH: High * Cepa con posteriores aislamientos positivos hasta 2012.

El estudio detallado de las resistencias fenotípicas del paciente diagnosticado con varios episodios de tuberculosis pulmonar (MDR_09_2007 paciente descrito anteriormente SP07-12/05) nos muestra como la primera cepa multirresistente (isoniacida y rifampicina) se detectó fenotípicamente en 2005. Esta cepa no se pudo recuperar para la confirmación de resistencias fenotípicas. En la primera cepa del año 2007 se mantuvo la baciloscopia positiva y la resistencia a isoniacida y rifampicina fenotípicamente y tras PCR- hibridación reversa se confirmó la resistencia a isoniacida y rifampicina, apareciendo un patrón de bandas con mutación en el promotor *inhA* y presencia de banda MUT1 que corresponde a la posición C-15T y mutación en el gen *rpoB* con presencia de banda en MUT2A (H526Y) y MUT3 (S531L).

En las cepas de este paciente (año 2007) se mantuvo la resistencia a isoniacida y rifampicina fenotípicamente, pero con la PCR- hibridación reversa sólo confirmó la resistencia a rifampicina, cambiando así el patrón de bandas apareciendo ahora solo la mutación en el gen *rpoB* y presencia de banda en MUT3 (S531L). En las cepas sucesivas de los años 2009 y 2010 fenotípicamente se mantuvo la resistencia a isoniacida y rifampicina, pero además adquirió resistencia a etambutol y pirazinamida.

Tras PCR- hibridación reversa se confirmó que se mantenía sólo la resistencia a rifampicina en la mutación del gen *rpoB* y presencia de banda en MUT3. En el año 2011 hasta finales de 2012 fenotípicamente se mantuvo igual, pero al realizar la PCR de hibridación reversa con el MTBDRs/ V.1.0 y V.2.0 se observó que también había adquirido resistencia a fluoroquinolonas apareciendo la mutación en el gen *gyrA* con

presencia de banda en MUT2 (S91P) pasando así a considerar como cepa XDR- TB (Tabla 4.14 y Figura 4.28).

Tabla 4.14.- Evolución a lo largo de los años de todas las cepas del paciente MDR-TB y descripción de las resistencias fenotípicamente y por PCR hibridación reversa.

Fecha Entrada	ATB	MTBDR _{plus} H/ R	MTBDR _s / V.1.0 (E/ FQ/ AG- PC)	MTBDR _s / V.2.0 (FQ/ AG- PC)
20/06/2005	HR	No recuperada	No recuperada	No recuperada
02/07/2007	H H ₂ R	HR (<i>rpoB</i> MUT2A, <i>MUT3/inhA</i> MUT1)	SENSIBLE	SENSIBLE
10/08/2007	H H ₂ R	R (<i>rpoB</i> MUT3)	SENSIBLE	SENSIBLE
10/09/2007	H H ₂ R	R (<i>rpoB</i> MUT3)	SENSIBLE	SENSIBLE
26/05/2009	H H ₂ R E Z	R (<i>rpoB</i> MUT3)	SENSIBLE	SENSIBLE
12/09/2009	H H ₂ R E Z	R (<i>rpoB</i> MUT3)	SENSIBLE	SENSIBLE
21/11/2009	H H ₂ R E Z	R (<i>rpoB</i> MUT3)	SENSIBLE	SENSIBLE
05/02/2010	H H ₂ R E Z	R (<i>rpoB</i> MUT3)	SENSIBLE	ENSIBLE
16/05/2010	H H ₂ R E Z	R (<i>rpoB</i> MUT3)	SENSIBLE	SENSIBLE
13/12/2011	H H ₂ R E Z	R (<i>rpoB</i> MUT3)	FQ (<i>gyrA</i> MUT2)	FQ (<i>gyrA</i> MUT2)
15/07/2012	H H ₂ R E Z	R (<i>rpoB</i> MUT3)	FQ (<i>gyrA</i> MUT2)	FQ (<i>gyrA</i> MUT2)
17/10/2012	H H ₂ R E Z	R (<i>rpoB</i> MUT3)	FQ (<i>gyrA</i> MUT2)	FQ (<i>gyrA</i> MUT2)

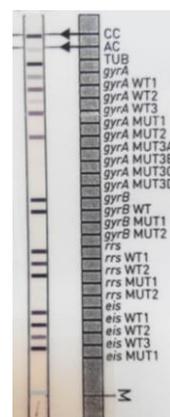
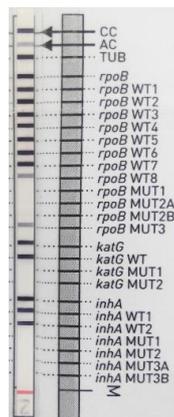
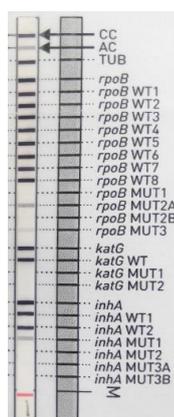
H: Isoniacida; R: Rifampicina; E: Etambutol; FQ: Fluoroquinolonas; AG- PC: Aminoglicósidos- Péptidos cíclicos

Figura 4.28.- Patrón de bandas de las resistencias detectadas por PCR- hibridación reversa del paciente MDR-TB a lo largo de los años.

a) *rpoB* MUT2A, *MUT3/ inhA* MUT1

b) *rpoB* MUT3

c) *gyrA* MUT2



4.5.- Secuenciación con MiSeq de Illumina® de aislados MDR-TB.

Se procedió a analizar de forma más completa aquellos casos de TB con aislamientos con multirresistencia detectados inicialmente en nuestro medio por métodos fenotípicos y/ o por métodos moleculares convencionales de PCR- hibridación reversa. Para ello se procedió a estudiar, a través de una estancia de 9 meses en la Unidad de Genómica de Tuberculosis, Área de Genómica y Salud a través del FISABIO (Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana).

Allí se realizó la secuenciación mediante MiSeq de Illumina de las cepas seleccionadas, en concreto se procedió al análisis tras secuenciación de los 9 casos MDR-TB detectados a lo largo del estudio. Entre ellos destacar el análisis genómico, en uno de los casos, de las 11 cepas recuperadas de un solo paciente entre 2005 y 2012, estudiando así la evolución en el tiempo de su resistencia.

Al introducir esta técnica de secuenciación sobre las cepas MDR-TB se perseguía obtener más información respecto a estos aislados, básicamente asociada a las aplicaciones de esta metodología ya referidas en el apartado correspondiente de Material y Métodos: i) obtención del genoma completo de cada cepa; ii) conocer a qué linaje y sublinaje pertenecen las cepas MDR-TB de nuestro medio; iii) analizar la posible transmisión de cepas en global de población estudiada; y iv) detectar mutaciones asociadas a posible resistencias a tuberculostáticos, tanto las incluidas en los sistemas comercializados utilizados en este estudio como aquellas otras no incluidas en ellos, por su menor frecuencia.

Para el estudio de estas cepas previamente a su traslado se sembraron e inactivaron en el laboratorio de microbiología del Hospital Universitario Doctor Peset para poder trabajar con ellas en el FISABIO, donde se realizó la extracción del ADN, la elaboración de librerías y su secuenciación.

4.5.1.- Linajes y Sublinajes de las cepas secuenciadas.

Estudiando los SNPs encontrados en las cepas secuenciadas se asignaron los

linajes y sublinajes pertenecientes a cada cepa (Tabla 4.15). El estudio filogenético a partir de los datos de secuenciación de las cepas seleccionadas nos mostró como, de las cepas incluidas, el 90% pertenecieron al linaje 4, mayoritario en la zona de Europa, América y África, mientras que tan solo una cepa pertenecía al linaje 2, que es el que se encuentra mayoritariamente en Asia. Dentro del linaje 2, donde se describen dos sublinajes, (el sublinaje Beijing y el protoBeijing) la cepa de nuestro medio se asoció al sublinaje Beijing.

Dentro de los sublinajes del linaje 4 los encontrados (sublinaje Haarlem, LAM y PGG3) fueron coincidentes con los mayoritarios.

Tabla 4.15.- SNPs de linajes y sublinajes encontrados.

Linaje	Sublinaje
Linaje 4: 2154724	Haarlem: 4323348 LAM: 1480024 PGG3: 1692141
Linaje 2: 497491	Beijing: 797736

4.5.2.- Secuenciación y detección de mutaciones y estudio de transmisión de cepas.

Los datos de secuenciación confirmaron la detección de mutaciones mediante los programas bioinformáticos *PhyResSE* (detecta las mutaciones más comunes) y *Kvarq* (permite detectar las mutaciones compensatorias del gen *rpoB* y las mutaciones menos frecuentes) para cada tuberculostático ensayado para cada cepa estudiada, se muestran los datos de forma descriptiva de los resultados. En la tabla 4.16 se puede observar el número y posición de mutaciones detectadas según el tuberculostático, la región en la que se encuentra y el cambio nucleotídico que produce dicha mutación, si se encuentra en una región codificante.

Tabla 4.16.- Resistencia a tuberculostáticos, SNPs, genes y cambios de nucleótidos.

Fármaco	SNP	ID Gen/ Nombre	Cambio AA'	Cambio codón	Región
Isoniacida	2155168	Rv1908c/ <i>katG</i>	Ser 315 Thr	AGC/ ACC	Codificante
	2155828*	<i>katG</i>			
	1673425	Rv1483/ <i>inhA</i>	-----	-----	Intergénica
	1674481	Rv1484/ <i>inhA</i>	Ser 94 Ala	TCG/ GCG	Codificante
Rifampicina	761101	Rv0667/ <i>rpoB</i>	Gln 432 Pro	CAA/ CCA	Codificante
	771110	Rv0667/ <i>rpoB</i>	Asp 435 Val	GAC/ GTC	Codificante
	761155	Rv0667/ <i>rpoB</i>	Ser 450 Leu	TCG/ TTG	Codificante
	761139*	<i>rpoB</i>			
	3877960*	<i>rpoA</i>			
	764817*	<i>rpoC</i>			
Etambutol	4247429	Rv3795/ <i>embB</i>	Met 306 Val	ATG/ GTG	Codificante
	4247729	Rv3795/ <i>embB</i>	Gly 406 Ser	GGC/ AGC	Codificante
	4247431	Rv3795/ <i>embB</i>	Met 306 Ile	ATG/ ATA	Codificante
	4243221	Rv3794/ <i>embA</i>	-----	-----	Intergénica
Estreptomina	1472362	MTB000019/ <i>rrs</i>	-----	-----	Ribosomal
	1472337	MTB000019/ <i>rrs</i>	-----	-----	Ribosomal
	781687	Rv0682/ <i>rpsL</i>	Lys 43 Arg	AAG/ AGG	Codificante
Pirazinamida	2289207	Rv2043c/ <i>pncA</i>	Asp 12 Ala	GAC/ GCC	Codificante
Fluoroquinolona	7572	Rv0006/ <i>gyrA</i>	Ser 91 Pro	TCG/ CCG	Codificante
Kanamicina	2715346	Rv 2416c/ <i>eis</i>	-----	-----	Intergénica

*mutaciones detectadas con el programa Kvarq. AA': aminoácido.

En la tabla 4.17 se comparan los resultados obtenidos por los tres métodos de detección de resistencias a los fármacos tuberculostáticos de las cepas MDR-TB: i) métodos fenotípicos mediante el sistema BACTEC MGIT 960; ii) métodos genotípicos convencionales basados en PCR de hibridación reversa; y iii) secuenciación del genoma mediante el sistema MiSeq de Illumina, donde se observan las similitudes y las discrepancias entre los distintos métodos utilizados.

Tabla 4.17.- Comparación de las resistencias detectadas a los tuberculostáticos de las cepas MDR-TB mediante los tres métodos de detección utilizados.

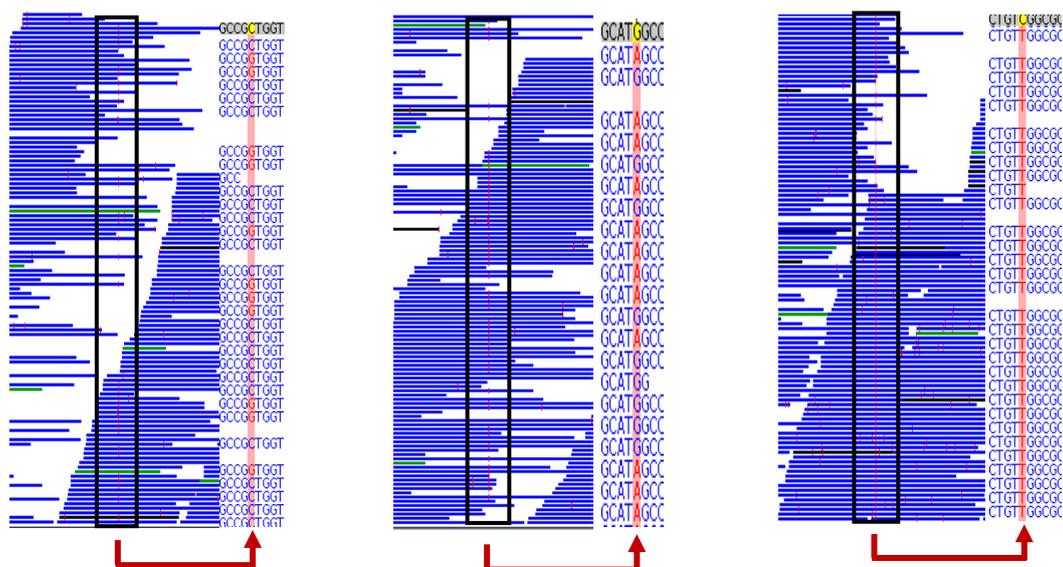
Cepa	Fenotipo	Genotipo convencional	Secuenciación
MDR_01_2006	H	<i>inhA</i>	<i>inhA</i>
	R	<i>rpoB</i>	<i>rpoB</i> <i>rrs</i>
MDR_02_2006	S, S ₂		<i>rrs</i>
	H, H ₂	<i>katG</i>	<i>katG, inhA</i>
	R	<i>rpoB</i>	<i>rpoB</i>
	Z		<i>pncA</i>
MDR_03_2007	S, S ₂		<i>rrs</i>
	H, H ₂	<i>katG</i>	<i>katG, inhA</i>
	Z	<i>rpoB</i>	<i>rpoB</i>
	P		<i>pncA</i>
MDR_04_2010	H, H ₂	<i>KatG</i>	<i>katG</i>
	R	<i>rpoB</i> <i>embB</i>	<i>rpoB</i> <i>embB</i>
MDR_05_2011	S		<i>rrs</i>
	H, H ₂	<i>inhA</i>	<i>katG</i>
	R	<i>rpoB</i>	<i>rpoB, rpoA</i>
	E, E ₂	ND	<i>embA, embB</i>
	Z		ND
MDR_06_2012	NT	<i>eis</i>	<i>eis</i>
	H, H ₂	<i>katG</i>	<i>katG</i>
MDR_07_2013	R	<i>rpoB</i>	<i>rpoB</i>
	S, S ₂		<i>rpsL</i>
	H, H ₂	<i>katG</i>	<i>katG</i>
	R	<i>rpoB</i>	<i>rpoB, rpoC</i>
	E	<i>embB</i>	<i>embB</i>
MDR_08_2015	Z		ND
	S		ND
MDR_09_2007-1	H	<i>inhA</i>	<i>inhA</i>
	R	<i>rpoB</i>	<i>rpoB</i>
	H, H ₂	<i>inhA</i>	<i>katG</i>
MDR_09_2007-2	R	<i>rpoB</i>	<i>rpoB</i>
	H, H ₂	ND	<i>katG</i>
	R	<i>rpoB</i>	<i>rpoB</i>
MDR_09_2010	H, H ₂	ND	<i>katG</i>
	R	<i>rpoB</i>	<i>rpoB</i>
	R	ND	<i>embB</i>
MDR_09_2012	H, H ₂	ND	<i>katG</i>
	R	<i>rpoB</i>	<i>rpoB</i>
	E	ND	<i>embB</i>
	Z		ND
MDR_09_2012	NT	<i>gyrA</i>	<i>gyrA</i>

NT: No testado, ND: No detectado

El análisis de cada uno de los 9 casos en cuanto a mutaciones en fármacos de primera y segunda línea, así como el estudio de transmisión de cepas y linajes se muestra de forma amplia y detalla en la tabla 4.18. Para la interpretación de los resultados expresados en esta tabla hay que tener presente que el porcentaje que aparece en la columna de secuenciación MiSeq Illumina es la frecuencia de lectura. Lo habitual es que sea del 100% o alrededor; eso significa que cada vez que se ha hecho una lectura en esa posición se ha encontrado siempre el mismo cambio nucleotídico que es el que da lugar a la mutación, y que por tanto la mutación está bien fijada. Puede aparecer una frecuencia de lectura más baja lo que significa que son mutaciones poco fijadas, en cada lectura no aparece siempre el mismo nucleótido (Figura 4.29).

Figura 4.29.- Ejemplos de frecuencia de lectura tras secuenciación en MiSeq de Illumina.

a) Frecuencia de lectura 40% b) Frecuencia de lectura 60% c) Frecuencia de lectura 100%



Las mutaciones en los genes *rpoB* y *katG* que confieren resistencia a rifampicina e isoniacida respectivamente, como están introducidas en las técnicas convencionales dan en éstas unos buenos resultados. De las cepas secuenciadas en el estudio en todos los casos hubo coincidencia, con excepción de un caso (MDR_09_2007) en el que la PCR- hibridación reversa no daba resistencia a isoniacida. Mediante la secuenciación se detectó una mutación poco frecuente en la posición genómica 2155828, codón Cys95Tyr, que codifica para el gen *katG*.

Respecto al etambutol también se observaron discrepancias entre los distintos métodos ensayados. Fenotípicamente la cepa MDR_04_2010 no expresa dicha resistencia, sí detecta con los métodos moleculares convencionales y con la secuenciación. Las cepas MDR_05_2011 y MDR_09_2007 expresan resistencia fenotípica a etambutol, que se confirma con la secuenciación, pero que no aparece tras PCR- hibridación reversa comercial al no ser mutaciones frecuentes no se pueden detectar con los métodos moleculares convencionales ya que estos métodos comerciales están validados para detectar las mutaciones más comunes.

La resistencia a pirazinamida se detectó inicialmente por métodos fenotípicos no pudiendo ser confirmada con los métodos genotípicos convencionales, al no existir ninguna técnica que la detecte. En las cepas MDR_05_2011, MDR_07_2013 y MDR_09_2007 con resistencia fenotípica a pirazinamida ésta no se pudo confirmar ni siquiera mediante secuenciación. En los casos de las cepas MDR_02_2006 y MDR_03_2007 está si se corresponde con la mutación en el gen *pncA*, que es la que codifica esta resistencia.

La resistencia a estreptomycin sólo se pudo comprobar mediante secuenciación, ya que no existe ninguna técnica molecular convencional que la incluya, debido a que no tiene una mutación mayoritaria fijada en una posición concreta. En nuestro estudio, entre las MDR-TB detectamos dos cepas con discrepancias: la MDR_01_2006, en la que fenotípicamente era sensible, pero con la secuenciación si se observó una mutación asociada a resistencia a la estreptomycin al aparecer la mutación en el gen *rrs* y la otra cepa la MDR_08_2005, donde fenotípicamente aparecía resistencia a estreptomycin, pero no se detectó ninguna mutación asociada a la estreptomycin tras secuenciación.

Tabla 4.18.- Mutaciones detectadas mediante secuenciación MiSeq de Illumina® y su comparación con método fenotípico y PCR- hibridación reversa (HAIN) mediante los ensayos (MTBDRplus H/ R), MTBDRs/V.1.0 (E, FQ, AG- PC) y MTBDRs/V.2.0 (FQ y AG- PC)

MDR_01_2006

Linaje: 4

Sublinaje: LAM

Fenotipo	MTBDRplus	MTBDRs/ V.1.0	MTBDRs/ V.2.0	Secuenciación MiSeq Illumina
H	<i>inhA</i> : WT1-MUT1_C-15T	No se detectan mutaciones en los genes <i>embB</i> , <i>gyrA</i> , ni <i>rrs</i> .	No se detectan mutaciones en los genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>rrs</i> ni <i>eis</i> .	<i>rrs</i> : 1472362 CT (98%) R173C <i>inhA</i> : 1673425 CT (100%)
R	<i>rpoB</i> : WT3,WT4 – MUT1_ D516V			<i>rpoB</i> : 761110 AT (100%) D435V

MDR_02_2006

Linaje: 4

Sublinaje: Haarlem

Fenotipo	MTBDRplus	MTBDRs/ V.1.0	MTBDRs/ V.2.0	Secuenciación MiSeq Illumina
S		No se detectan mutaciones en los genes <i>embB</i> , <i>gyrA</i> , ni <i>rrs</i> .	No se detectan mutaciones en los genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>rrs</i> ni <i>eis</i> .	<i>rrs</i> : 1472362 CY(30,6%) R173C
S ₂				<i>katG</i> : 2155168 CG (100%) S315T
H	<i>katG</i> : WT-MUT1_ S315T			<i>inhA</i> : 1674481 TG (98%) S94A
H ₂				<i>rpoB</i> : 761155 CT (98,5%) S450L
R	<i>rpoB</i> : WT8-MUT3_ S531L			<i>pncA</i> : 2289207 TG (100%) D12A
Z				

MDR_03_2007

Linaje: 4

Sublinaje: Haarlem

Fenotipo	MTBDRplus	MTBDRs/V.1.0	MTBDRs/V.2.0	Secuenciación MiSeq Illumina
S		No se detectan mutaciones en los genes <i>embB</i> , <i>gyrA</i> , ni <i>rrs</i> .	No se detectan mutaciones en los genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>rrs</i> ni <i>eis</i> .	<i>rrs</i> : 1472362 CT(94,4%) R173C
S ₂				
H	<i>katG</i> : WT-MUT1_ S315T			<i>katG</i> : 2155168 CG (100%) S315T
H ₂				<i>inhA</i> : 1674481 TG (100%) S94A
R	<i>rpoB</i> : WT8-MUT3_ S531L			<i>rpoB</i> : 761155 CT (100%) S450L
Z				<i>pncA</i> : 2289207 TG (100%) D12A

MDR_04_2010

Linaje: 4

Sublinaje: LAM y Haarlem

Fenotipo	MTBDRplus	MTBDRs/V.1.0	MTBDRs/V.2.0	Secuenciación MiSeq Illumina
H	<i>katG</i> : MUT1_ S315T		No se detectan mutaciones en los genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>rrs</i> ni <i>eis</i> .	<i>katG</i> : 2155168 CG (43%) S315T
H ₂				
R	<i>rpoB</i> : MUT3_ S531L			<i>rpoB</i> : 761155 CT (43%) S450L
		<i>embB</i> : MUT1A_ M306I		<i>embB</i> : 4247431 GA (62%) M306I

MDR_05_2011

Linaje: 2

Sublinaje: Beijing

Fenotipo	MTBDRplus	MTBDRs/ V.1.0	MTBDRs/ V.2.0	Secuenciación MiSeq Illumina	
S				<i>rrs</i> : 1472362 CT (98%) R173C	
H	<i>katG</i> : WT-MUT1_ S315T	No se detectan mutaciones en los genes <i>embB</i> , <i>gyrA</i> , ni <i>rrs</i> .		<i>katG</i> : 2155168 CG (100%) S315T	
H ₂					
R	<i>rpoB</i> : WT8-MUT3_ S531L				<i>rpoB</i> : 761155 CT (99%) S450L
E					<i>rpoA</i> : 3877960 AG (100%) V183A
E ₂					<i>embA</i> : 4243221 CT(100%)
Z					<i>embB</i> : 4247729 GA (100%) G406S
				<i>eis</i> : WT2-MUT1_ C-14T	

MDR_06_2012

Linaje: 4

Sublinaje: Haarlem

Fenotipo	MTBDRplus	MTBDRs/ V.1.0	MTBDRs/ V.2.0	Secuenciación MiSeq Illumina
H	<i>katG</i> : WT- MUT1_ S315T	No se detectan mutaciones en los genes <i>embB</i> , <i>gyrA</i> , ni <i>rrs</i> .	No se detectan mutaciones en los genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>rrs</i> ni <i>eis</i> .	<i>katG</i> : 2155168 CG (100%) S315T
H ₂				
R	<i>rpoB</i> : WT8-MUT3_ S531L			

MDR_07_2013

Linaje: 4

Sublinaje: PGG3

Fenotipo	MTBDRplus	MTBDRs/V.1.0	MTBDRs/V.2.0	Secuenciación MiSeq Illumina
S			No se detectan mutaciones en los genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>rrs</i> ni <i>eis</i> .	<i>rpsL</i> : 781687 AG (100%) K43R
S ₂				
H	<i>katG</i> : WT-MUT1_ S315T			<i>katG</i> : 2155168 CG (100%) S315T
H ₂				
R	<i>rpoB</i> : WT2.WT3 – MUT1_ Q513L			<i>rpoB</i> : 761101AC (100%) Q432P <i>rpoC</i> : 764817 TG (100%) V483G <i>embB</i> : 4247429 AG(100%) M306V
E		<i>embB</i> : WT1- MUT1B_ M306V		
Z				

MDR_08_2015

Linaje: 4

Sublinaje: Haarlem

Fenotipo	MTBDRplus	MTBDRs/V.1.0	MTBDRs/V.2.0	Secuenciación MiSeq Illumina
S		No se detectan mutaciones en los genes <i>embB</i> , <i>gyrA</i> , ni <i>rrs</i> .	No se detectan mutaciones en los genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>rrs</i> ni <i>eis</i> .	
H	<i>inhA</i> : MUT1_ C-15T			<i>inhA</i> : 1673425 CT (46%)
R	<i>rpoB</i> : WT8-MUT2A, MUT3_H526Y,S531L			<i>rpoB</i> : 761139 C- GT (32%- 68%) G(H445D) T(H445Y)

MDR_09_2007

Linaje: 4

Sublinaje: PGG3

Fecha Entrada	Fenotipo	MTBDRplus	MTBDRs/V.1.0	MTBDRs/V.2.0	Secuenciación MiSeq Illumina
20/06/2005	HR	No se ha	podido	recuperar	la cepa
02/07/2007	H H ₂ R	HR (<i>rpoB</i> MUT2A, MUT3/ <i>inhA</i> MUT1)	No se detectan mutaciones en los genes <i>embB</i> , <i>gyrA</i> , ni <i>rfs</i> .	No se detectan mutaciones en los genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>rfs</i> ni <i>eis</i> .	KatG: 2155828- TC (100%) Y95C <i>rpoB</i> : 761155- CT (100%) S450L <i>embB</i> : 4247729- GA (98%) G406S
10/08/2007	H H ₂ R	R (<i>rpoB</i> MUT3)	No se detectan mutaciones en los genes <i>embB</i> , <i>gyrA</i> , ni <i>rfs</i> .	No se detectan mutaciones en los genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>rfs</i> ni <i>eis</i> .	KatG: 2155828- TC (100%) Y95C <i>rpoB</i> : 761155- CT (100%) S450L <i>embB</i> : 4247729- GA (98%) G406S
10/09/2007	H H ₂ R	R (<i>rpoB</i> MUT3)	No se detectan mutaciones en los genes <i>embB</i> , <i>gyrA</i> , ni <i>rfs</i> .	No se detectan mutaciones en los genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>rfs</i> ni <i>eis</i> .	KatG: 2155828- TC (100%) Y95C <i>rpoB</i> : 761155- CT (100%) S450L <i>embB</i> : 4247729- GA (98%) G406S
26/05/2009	H H ₂ R E Z	R (<i>rpoB</i> MUT3)	No se detectan mutaciones en los genes <i>embB</i> , <i>gyrA</i> , ni <i>rfs</i> .	No se detectan mutaciones en los genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>rfs</i> ni <i>eis</i> .	KatG: 2155828- TC (100%) Y95C <i>rpoB</i> : 761155- CT (100%) S450L <i>embB</i> : 4247729- GA (98%) G406S
12/09/2009	H H ₂ R E Z	R (<i>rpoB</i> MUT3)	No se detectan mutaciones en los genes <i>embB</i> , <i>gyrA</i> , ni <i>rfs</i> .	No se detectan mutaciones en los genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>rfs</i> ni <i>eis</i> .	KatG: 2155828- TC (100%) Y95C <i>rpoB</i> : 761155- CT (100%) S450L <i>embB</i> : 4247729- GA (98%) G406S
21/11/2009	H H ₂ R E Z	R (<i>rpoB</i> MUT3)	No se detectan mutaciones en los genes <i>embB</i> , <i>gyrA</i> , ni <i>rfs</i> .	No se detectan mutaciones en los genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>rfs</i> ni <i>eis</i> .	KatG: 2155828- TC (100%) Y95C <i>rpoB</i> : 761155- CT (100%) S450L <i>embB</i> : 4247729- GA (98%) G406S
05/02/2010	H H ₂ R E Z	R (<i>rpoB</i> MUT3)	No se detectan mutaciones en los genes <i>embB</i> , <i>gyrA</i> , ni <i>rfs</i> .	No se detectan mutaciones en los genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>rfs</i> ni <i>eis</i> .	KatG: 2155828- TC (100%) Y95C <i>rpoB</i> : 761155- CT (100%) S450L <i>embB</i> : 4247729- GA (98%) G406S

16/05/2010	H H ₂ R E Z	R (<i>rpoB</i> MUT3)	No se detectan mutaciones en los genes <i>embB</i> , <i>gyrA</i> , ni <i>rrs</i> .	No se detectan mutaciones en los genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>rrs</i> ni eis.	KatG: 2155828- TC (100%) Y95C <i>rpoB</i> : 761155- CT (100%) S450L <i>embB</i> : 4247729- GA (98%) G406S
13/12/2011	H H ₂ R E Z	R (<i>rpoB</i> MUT3)	FQ (<i>gyrA</i> MUT2)	FQ (<i>gyrA</i> MUT2)	KatG: 2155828- TC (100%) Y95C <i>rpoB</i> : 761155- CT (100%) S450L <i>embB</i> : 4247729- GA (98%) G406S <i>gyrA</i> : 7572- TC (100%) S91P
15/07/2012	H H ₂ R E Z	R (<i>rpoB</i> MUT3)	FQ (<i>gyrA</i> MUT2)	FQ (<i>gyrA</i> MUT2)	KatG: 2155828- TC (100%) Y95C <i>rpoB</i> : 761155- CT (100%) S450L <i>embB</i> : 4247729- GA (98%) G406S <i>gyrA</i> : 7572- TC (100%) S91P
17/10/2012	H H ₂ R E Z	R (<i>rpoB</i> MUT3)	FQ (<i>gyrA</i> MUT2)	FQ (<i>gyrA</i> MUT2)	KatG: 2155828- TC (100%) Y95C <i>rpoB</i> : 761155- CT (100%) S450L <i>embB</i> : 4247729- GA (98%) G406S <i>gyrA</i> : 7572- TC (100%) S91P

Descripción detallada a partir de la tabla 4.18 de las nueve cepas MDR-TB secuenciadas:

MDR_01_2006: Con los tres métodos de análisis de resistencias coinciden los resultados a excepción de la estreptomina que sólo aparece con la secuenciación. Al aparecer únicamente mediante secuenciación la mutación asociada a resistencia a la estreptomina y no tener pruebas fenotípicas que nos lo confirmen, no podemos asegurar que la cepa es resistente a estreptomina. Son resistencias bien fijadas porque los porcentajes de lectura son altos del 100%, eso significa que cada vez que se ha hecho una lectura en esa posición se ha encontrado siempre el mismo cambio nucleotídico que es el que da lugar a la mutación.

MDR_02_2006 y MDR_03_2007: El estudio de transmisión a partir de resultados de secuencias mostró como las cepas MDR_02_2006 y MDR_03_2007 fueron cepas transmitidas ya que sólo mostraron 2 SNPs de diferencia. La primera cepa es la que ha sido transmitida, siendo la cepa original, al tener un menor porcentaje de frecuencia de lectura (30,6%). Tras contrastar con el antibiótico se seleccionaría la cepa resistente, que es la que se transmite, aumentando el porcentaje de frecuencia (94,4%). Se revisó la historia clínica de estos dos pacientes y “a priori” no se pudo establecer el posible contacto entre ellos, siendo además de años distintos (2006 y 2007). Una posible explicación es que la cepa MDR_3_2007 es resistente a un porcentaje muy bajo, pero al darle medicamento se selecciona la cepa resistente.

MDR_04_2010: Se detectó la coexistencia de dos poblaciones, teniendo presente dos hechos: que esta cepa tenía sólo 400 SNPs heterocigotos, cuando lo normal es que tengan unos 900 SNPs, y la identificación de dos SNPs filogenéticos pertenecientes a diferentes sublinajes. Las dos pertenecían al linaje 4, pero la cepa resistente a isoniacida y rifampicina, con un 40% de frecuencia de lectura, pertenece al sublinaje LAM y la cepa resistente a etambutol, con un 60% de frecuencia, pertenece al sublinaje Haarlem. Fenotípicamente no se detectaba la resistencia al etambutol, pero con la PCR-hibridación reversa y la secuenciación sí.

MDR_05_2011: Es una cepa pre-XDR-TB porque es resistente a isoniacida, rifampicina y a kanamicina con la aparición de la mutación en el gen *eis*, no llega a ser un caso de

XDR-TB porque le falta resistencia a fluoroquinolonas. Además, apareció la mutación *rpoA* que es una mutación compensatoria del gen *rpoB*, mutación asociada a resistencia a rifampicina. La resistencia a etambutol detectada por secuenciación es una mutación poco frecuente por eso no se puede detectar con los métodos moleculares convencionales ya que estos métodos comerciales están validados para detectar las mutaciones más comunes.

MDR_06_2012: Con los tres métodos de análisis de resistencias coinciden los resultados.

MDR_07_2013: En esta cepa se detectó una deleción en el gen *pncA* en posición 2289091 (deleción de G). Lo que daría una posible resistencia fenotípica a pirazinamida. También se detecta la mutación *rpoC* que es otra una mutación compensatoria del gen *rpoB*. La resistencia a estreptomycin en este caso está asociada a la mutación en el gen *rpsL*. La mutación al etambutol se confirmó por las tres técnicas.

MDR_08_2015: En la cepa MDR_08_2015 la resistencia a rifampicina se detectó en el gen *rpoB* en una posición diferente a lo habitual, en concreto en el SNP 761139, apareciendo dos cambios nucleotídicos: uno con menor frecuencia (C- G 32% H445D) y otro con un porcentaje más elevado (C- T 68% H445Y). Puede que las dos subpoblaciones desaparezcan con el tratamiento o que se mantengan coexistiendo en el tiempo.

MDR_9_2007: Son todo cepas del mismo paciente, desde la primera cepa secuenciada en 2005 a la última en 2012 hay 6 SNPs de diferencia en ellas es un caso de microevolución intrapaciente.

Mediante la secuenciación se detectó resistencia a isoniacida, mutación poco frecuente en la posición genómica 2155828, codón Cys95Tyr, que codifica para el gen *katG* y las mutaciones a rifampicina etambutol y fluoroquinolonas que corresponden a las detectadas por métodos genotípicos convencionales y fenotípicamente. Lo que no se detecta es la resistencia a la pirazinamida

Este paciente ingresó por primera vez en el HUDr. Peset en el año 2001 donde se le diagnóstico de TBP por *Mycobacterium tuberculosis* sensible, BAAR negativo, iniciando el tratamiento antituberculostático (2RHPE/ 4RH). En 2003 continua con BAAR negatividad y se reinicia el mismo tratamiento al mantener la TB sensible. En 2005 se le diagnosticó TBP multirresistente fenotípicamente, se trató con pirazinamida, claritromicina, linezolid y moxifloxacino. En 2007 desde microbiología se confirma la baciloscopia positiva, manteniendo MDR-TB similar y tratamiento. El paciente se trató para TB pero en ninguna de las ocasiones completa el tratamiento y no acude a consultas externas de neumología. En 2009 continua con baciloscopia positiva con cepas MDR-TB y además se detecta resistencia a etambutol y pirazinamida. Se modifica la pauta a moxifloxacino, capreomicina, pirazinamida y etambutol. A finales del 2011 mantiene las resistencias, pero además adquirió resistencia a fluoroquinolonas, pasando a ser una cepa pre-XDR-TB, confirmándose las resistencias por PCR-hibridación reversa y secuenciación. En 2012 mantenía el mismo cuadro pulmonar, en serología se le confirmó como VIH negativo. Se inició tratamiento con capreomicina, estreptomian, etambutol y levofloxacino, sin complicaciones inmediatas.

Finalmente se decide su ingreso en el hospital de crónicos (Hospital Doctor Moliner) para tratamiento intrahospitalario por catéter central de inserción periférica (PICC) modificando el tratamiento a capreomicina, linezolid, etambutol y cicloserina, pasando a ser controlado por la unidad de hospitalización domiciliaria para tratamiento directamente observado. Tras 8 meses se confirma la curación microbiológica con negativización de baciloscopia y cultivos. El 2016 se descarta reactivación de MTB, pero aparece un nuevo cuadro pulmonar con infección por *Aspergillus fumigatus* sobre cavernas tuberculosas, con cultivos positivos en esputo, lavado broncoalveolar y biopsia pulmonar por lo que inicia tratamiento con antifúngicos.

A partir de la secuenciación se pudieron detectar mutaciones compensatorias del gen *rpoB* (la *rpoA* y la *rpoC*) estas mutaciones compensan por la pérdida de eficacia asociada a las mutaciones de resistencia a antibióticos en el gen *rpoB*.

Se confirmó que en nuestra área no hay ninguna cepa extremadamente resistente (XDR-TB) pero sí que hay dos cepas pre- extremadamente resistentes (pre-XDR-TB) la MDR_5_2011 porque tiene resistencia isoniacida, rifampicina y a

kanamicina de bajo nivel con la mutación en el gen *eis* y la cepa MDR_09_2007 que tiene resistencia a isoniacida, rifampicina y a fluoroquinolonas con una mutación en el gen *gyrA*. El resto de las cepas secuenciadas son multirresistentes (MDR-TB).

4.6.- PCR en tiempo real para *Mycobacterium tuberculosis* complex sobre muestras de pacientes.

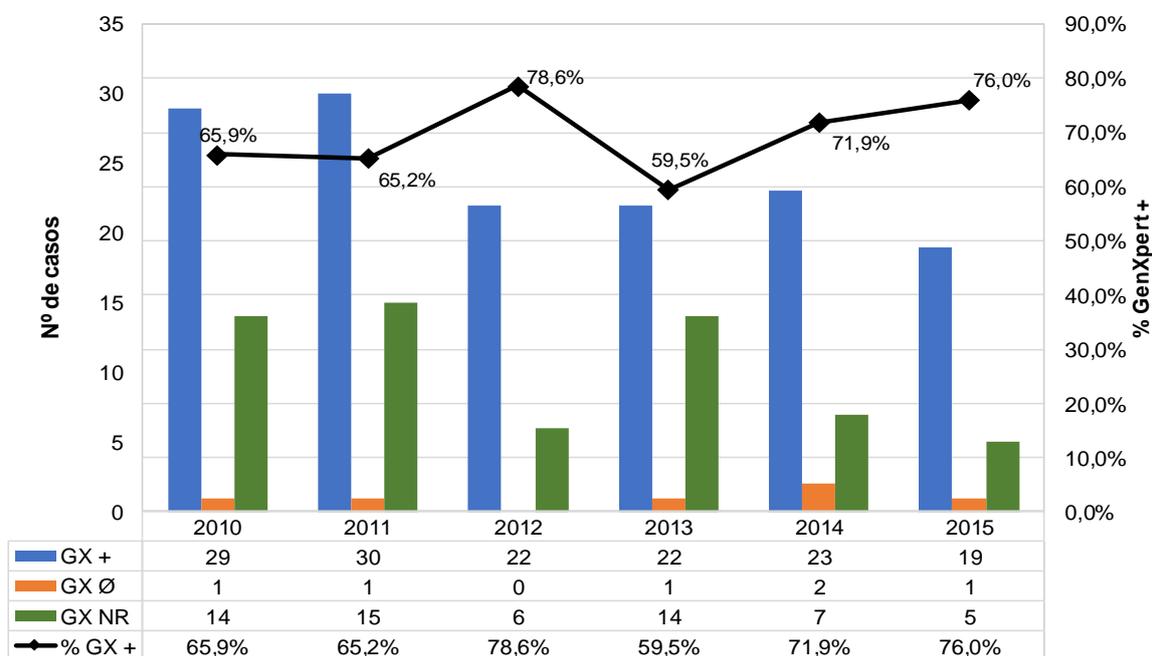
4.6.1.- PCR en tiempo real sobre casos confirmados de tuberculosis.

Durante el periodo de estudio se analizaron los resultados de la prueba de PCR en tiempo real obtenidos tras realización sobre muestra directa de paciente remitido para estudio de tuberculosis de la técnica GeneXpert MTB/ RIF (Cepheid®), que detecta simultáneamente presencia de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* complex y/ o mutación que codifica resistencia a rifampicina.

De los 212 casos de tuberculosis confirmados en los últimos seis años del estudio (2010- 2015) cuando se introdujo la técnica de PCR en tiempo real para diagnóstico de TB, se pudo realizar esta prueba en 151 casos (71,2%), ya que los 61 restantes se diagnosticaron a partir del crecimiento en cultivo sin petición expresa de PCR. El número de casos sobre los que no se realizó la PCR fue disminuyendo durante el estudio. En la figura 4.30 se muestra la distribución por año de los resultados del GeneXpert (positivo, negativo y no realizado).

De los 151 casos donde se realizó la técnica en casos de TB confirmada en 145 el resultado fue positivo siendo 6 (4%) casos con aislamiento de MTB los que dieron un resultado falso negativo. Estos correspondieron a: 5 casos de TBEP (2 biopsias pleurales, 1 biopsia peritoneal, 1 líquido pleural y 1 PAAF) y un caso de TBP donde la PCR fue negativa a partir del broncoaspirado.

Figura 4.30.- Resultados de GeneXpert sobre muestra directa en 151 casos de tuberculosis confirmada.



La distribución de resultados de GeneXpert por años en función del tipo de tuberculosis (pulmonar/ extrapulmonar) y baciloscopia se muestra en la tabla 4.19. Se incluyen los 145 casos con cultivo y PCR positivos. Se describen 113 casos pulmonares y 32 extrapulmonares donde GeneXpert proporcionó un diagnóstico rápido de confirmación de presencia de MTB. La rentabilidad de la baciloscopia comparada con GeneXpert fue menor (92 casos positivos) por lo que en 53 casos se llegó al diagnóstico de tuberculosis por PCR a partir de petición de esta prueba a pesar de la negatividad de las baciloscopias dada la elevada sospecha clínica radiográfica del caso. Los 6 casos negativos se distribuyeron por años en :1 caso en 2010 (biopsia pleural), 1 en 2011 (biopsia pleural), 1 en 2013 (biopsia peritoneal) 2 en 2014 (líquido pleural y PAAF de ganglio en tuberculosis linfática extratorácica) y 1 en 2015 (broncoaspirado).

Tabla 4.19.- Resultado de GeneXpert sobre muestra inicial en casos de tuberculosis con aislamiento positivo según localización y baciloscopia.

AÑO	GX +	TUBERCULOSIS		BACILOSCOPIA	
		TBP	TBEP	BAAR +	BAAR Ø
2010	29	26	3	22	7
2011	30	19	11	24	6
2012	22	19	3	14	8
2013	22	19	3	15	7
2014	23	16	7	10	13
2015	19	14	5	7	12
TOTAL	145	113	32	92	53

4.6.2.- PCR en tiempo real sobre casos grupo control sin tuberculosis.

A lo largo de los 6 años del estudio se realizaron 126 PCR mediante GeneXpert MTB/ RIF a partir de las peticiones al Servicio de Microbiología por “sospecha inicial de tuberculosis” no siempre bien justificada donde no se objetivó positividad tras cultivo en Löwenstein- Jensen ni en sistema automatizado MGIT 960 tras su procesamiento e incubación adecuados, se muestra en la tabla 4.20.

Tabla 4.20.- “Justificación” de petición de GeneXpert MTB/ RIF en casos con negatividad de cultivo y no confirmación microbiológica de TB.

Justificación de la petición	TB Cultivo + n= 151	TB Cultivo Ø n= 126
a) Baciloscopia positiva	92	6
b) Posible reactivación TB	11	12
c) Paciente con VIH	21	22
d) Sospecha TB en paciente de edad pediátrica	1	15
e) Sospecha clínica de tuberculosis (TBP/ TBEP) en adultos	114	12
f) Patología pulmonar no específica	7	29
g) No patología pulmonar/ extrapulmonar de sospecha TB	5	30

- a) Entre las baciloscopias positivas (98 casos) 6 de éstas (6,1%) correspondieron a pacientes sin TB confirmada con aislamiento en todos ellos de micobacteria no

tuberculosa (MNT): 2 *Mycobacterium abscessus*, 2 *Mycobacterium chelonae*, 1 *Mycobacterium intracellulare* y 1 *Mycobacterium kansasii* de 4 esputos, 1 exudado y una biopsia cutánea. El diagnóstico de PCR en tiempo real negativo en pacientes con baciloscopia positiva sirvió en estos casos para descartar una TB y sospechar micobacteriosis, evitando un tratamiento específico sobre muestra de baciloscopia positiva.

- b) En 23 pacientes se solicitó PCR justificada por TB previa en años anteriores y/o posible reactivación. En 12 peticiones se confirmó negatividad de la PCR sobre muestra inicial, descartando de entrada esa posible reactivación, confirmado además por la negatividad del cultivo.
- c) De las 43 justificaciones por paciente con VIH, 22 peticiones (51,2%) mostraron PCR y cultivo negativo para TB, con aislamientos de MNT en 4 de estos pacientes, todos ellos con baciloscopia negativa (2 *Mycobacterium intracellulare*, 1 *Mycobacterium avium* y 1 *Mycobacterium chelonae*).
- d) En solo una de las 16 peticiones de PCR justificadas por sospecha de TB en pacientes pediátricos, todas ellas baciloscopia negativa, el resultado fue positivo con confirmación posterior tras cultivo de TB. En los 15 casos restantes la PCR inicial descartó la presencia de TB en estos pacientes.
- e) En 12 solicitudes de las 126 por sospecha clínica elevada de TB, ésta no se confirmó microbiológicamente (cultivo y PCR negativa). La PCR sirvió en estos casos para descartar inicialmente el proceso tuberculoso.
- f) Los últimos dos grupos (patología pulmonar no específica- 36 casos y No sospecha de TB- 35 casos) correspondieron a casos donde se realizó PCR por petición clínica. Tras revisión de la HC ésta se consideró como no justificada clínicamente. En 12 de las 71 peticiones (16,9%) sin embargo sí se llegó al diagnóstico de TB inicialmente no justificado. En los 59 casos restantes sin sospecha real de TB la PCR confirmó de entrada la negatividad de MTB.

4.6.3.- Estudio de la capacidad predictiva de GeneXpert como prueba diagnóstica de tuberculosis.

Los resultados de los cálculos de S, E, VPP y VPN para esta técnica de PCR realizada sobre un tamaño muestral de 277 (145 con PCR positiva y 132 negativos) utilizando como *gold standard* el cultivo de TB (151 positivos y 126 negativos) se especifican en la tabla 4.21 donde se compara además con los resultados obtenidos tras baciloscopia.

Se puede observar que en el caso de GeneXpert sobre muestra directa, se muestra muy sensible y con elevada especificidad y valores predictivos, tanto negativo como positivo, con cifras con encima del 95%.

Tabla 4.21.- Valores de la capacidad predictiva de GeneXpert comparados con la baciloscopia (intervalo confianza 95%).

	Cultivo Positivo	Cultivo Negativo	Total
GeneXpert Positivo	145	3	148
GeneXpert Negativo	6	126	132
Total GX	151	129	280
BAAR Positivo	92	6	98
BAAR Negativo	53	129	182
Total BAAR	145	135	280

*se incluyen 3 PCR positivas sin confirmación de cultivo.

	GeneXpert	Baciloscopia
SENSIBILIDAD	96,03% (91,17 - 98,37)	63,45% (55,01 - 71,17)
ESPECIFICIDAD	97,67% (92,84 - 99,40)	95,56% (90,16 - 98,18)
VALOR PREDICTIVO POSITIVO	97,97% (93,73 - 99,48)	93,88% (86,63 - 97,49)
VALOR PREDICTIVO NEGATIVO	95,45% (89,95 - 98,14)	70,88% (63,61 - 77,24)

En el caso de la valoración de la baciloscopia, como técnica rápida de detección de posible tuberculosis, esta técnica presenta una buena especificidad (95,56%) aunque ligeramente menor que con GeneXpert y un valor predictivo positivo más bajo (93,88%). Sin embargo, la sensibilidad es baja (63,45%) y además el valor predictivo negativo no

supera el 75%. Así, la negatividad de una baciloscopia no es un dato valorable cuando existe sospecha de TB, pero, además al describir casos BAAR positivos con aislamientos posteriores de MNT será la confirmación por PCR desde muestra lo que nos puede indicar esa falsa positividad si valoramos la ausencia posterior de crecimiento de MTB.

4.7.- Demora microbiológica de TB confirmada en el Departamento de Salud Valencia- Doctor Peset.

4.7.1.- Demora microbiológica en el HUDr. Peset.

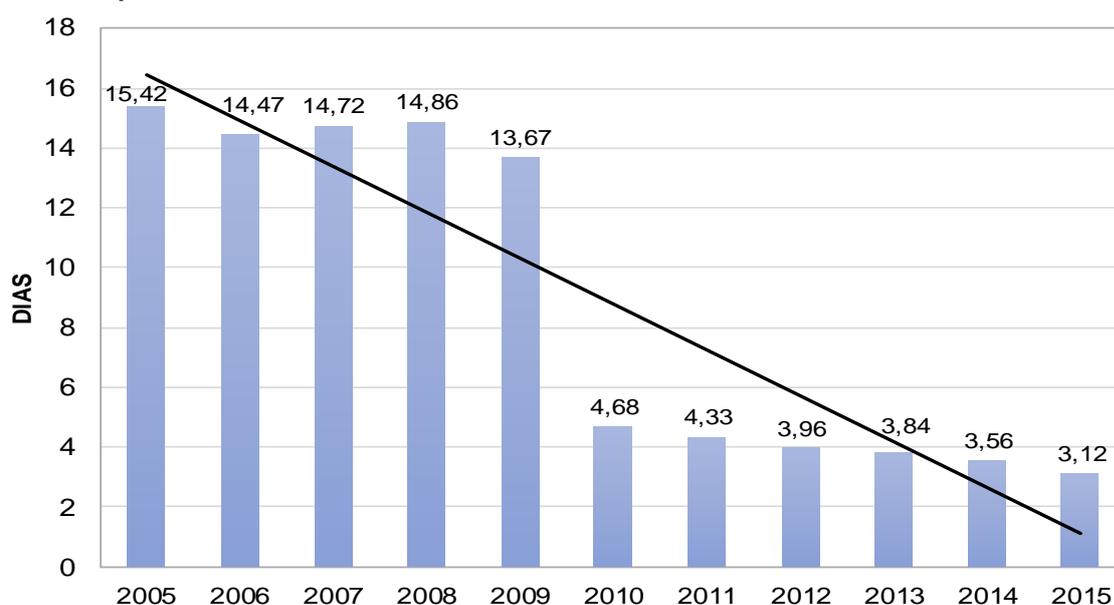
Uno de los objetivos básicos para el correcto control y manejo de un paciente con TB es su diagnóstico precoz a partir de sospecha clínica y métodos rápidos de confirmación. La lentitud del diagnóstico convencional de la TB es uno de los parámetros clásicos que se mejora con la aplicación de nuevos métodos rápidos y eficaces en el diagnóstico no sólo de especie MTB sino de presencia de cepas resistentes a fármacos de primera línea, como es el caso de la rifampicina.

En los datos oficiales publicados en el Boletín Epidemiológico Semanal de la RENAVE o en los Informes de Salud- TB de la Conselleria de Sanitat de la Comunitat Valenciana de los últimos años, se insiste en la importancia de disminuir esta “demora diagnóstica” en la declaración de la enfermedad. Estos informes manejan demoras de declaración desde los síntomas iniciales del paciente hasta la declaración obligatoria del caso diferenciando entre demora clínica y demora microbiológica (de confirmación). Los días (semanas) que se declaran en los informes van disminuyendo con los años y en este punto la mejora y rapidez del estudio microbiológico juega un papel fundamental.

La demora “microbiológica” obtenida en este estudio se basó en el cálculo del periodo de tiempo en días desde que se recibe la muestra del paciente en el Servicio de Microbiología desde sus distintos lugares de origen, hasta que se llega al diagnóstico de especie de MTB como agente causal presente en la muestra del caso sospecha de TB. El Servicio de Microbiología del HUDr. Peset un Servicio de atención continuada de

24 horas durante todos los años del estudio. Por ello, la demora dependió a lo largo de los años de estudio del tipo de muestra, resultado de baciloscopia y en especial del método utilizado en la identificación de especie y/ o detección de resistencias. La evolución en días de la demora microbiológica obtenida a lo largo de los años del estudio se muestra en la figura 4.31.

Figura 4.31.- Evolución de la demora de confirmación de MTB en muestra de caso de TB en el Departamento de Salud Valencia- Dr. Peset.



Año	Demora microbiológica ($\bar{X} \pm \text{STD}$)
2005	15,42 \pm 8,45 días
2006	14,47 \pm 6,75 días
2007	14,72 \pm 7,99 días
2008	14,86 \pm 7,14 días
2009	13,67 \pm 6,01 días
2010*	4,68 \pm 5,99 días
2011*	4,33 \pm 5,47 días
2012*	3,96 \pm 4,56 días
2013*	3,84 \pm 5,42 días
2014*	3,56 \pm 5,98 días
2015*	3,12 \pm 5,21 días

* En los años 2010- 2015 la mediana fue <48 horas al utilizar el sistema GeneXpert MTB/ RIF de PCR en tiempo real de muestras BAAR+ o con elevada sospecha diagnóstica desde la petición del clínico para detección de presencia de *M. tuberculosis* y/ o resistencia a rifampicina.

En un primer periodo, entre 2005- 2009, se utilizaba como diagnóstico de MTB al sistema Accuprobe TBC (BioMérieux) a partir del crecimiento en MGIT y/ o LJ para identificación de especie desde crecimiento de masa en medio de cultivo. La

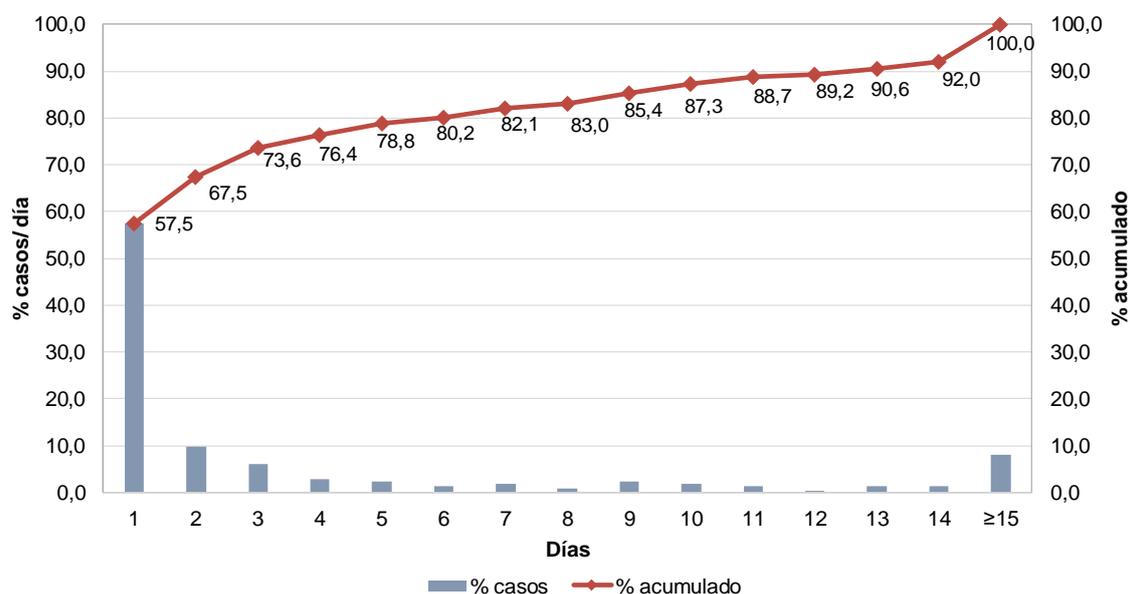
identificación estuvo, por tanto, ligada a los días de crecimiento de la cepa, que oscila en MGIT con una media de 14,6 días ya que la técnica se realizaba el mismo día de la detección de crecimiento.

Tras cambiar en 2010 a la utilización de inmunocromatografía para TB (BD[®]) desde MGIT y/ o PCR en tiempo real desde muestra directa (GeneXpert MTB/ RIF (Chepeid[®]) la demora disminuyó de forma significativa a una media de 3,9 días. De hecho, en muchas ocasiones el resultado se obtuvo a las tres horas de la recepción de la muestra y procesamiento para técnica de PCR a tiempo real desde muestra directa. La introducción de la inmunocromatografía sobre MGIT en el momento del crecimiento, con resultados de especie de TB en 15 minutos desde cultivo líquido supuso igualmente una mejora en la rapidez de los resultados.

En la figura 4.32 se representa la demora microbiológica en la identificación en presencia confirmada de MTB en los últimos años del periodo estudiado donde se incluyó la RT- PCR directa y técnica de IC desde MGIT. El 76,4% de los casos se diagnosticaron en los 4 primeros días tras obtención de la muestra del paciente, siendo el 57,5% identificados en las primeras 24 horas al utilizarse PCR en tiempo real. En la curva de porcentaje acumulado de casos se observa que más del 90% (92,0%) de los casos del periodo estudiado se confirmaron en las dos primeras semanas, siendo sólo el 8% los casos que necesitan ≥ 15 días para confirmación diagnóstica, en casos de baciloscopia negativa o con crecimiento más lento en cultivo.

Entre los casos diagnosticados en las primeras 24 horas se incluyeron los 5 pacientes con resistencia a rifampicina asociada a isoniacida (de los 9 casos totales de cepas MDR-TB) tanto con baciloscopia positiva como negativa, al realizarse GeneXpert MTB/ RIF sobre muestra directa. Así, todos los casos MDR-TB del periodo estudiado entre 2010 a 2015 se diagnosticaron como TB con resistencia a rifampicina el mismo día de la petición al Servicio de Microbiología.

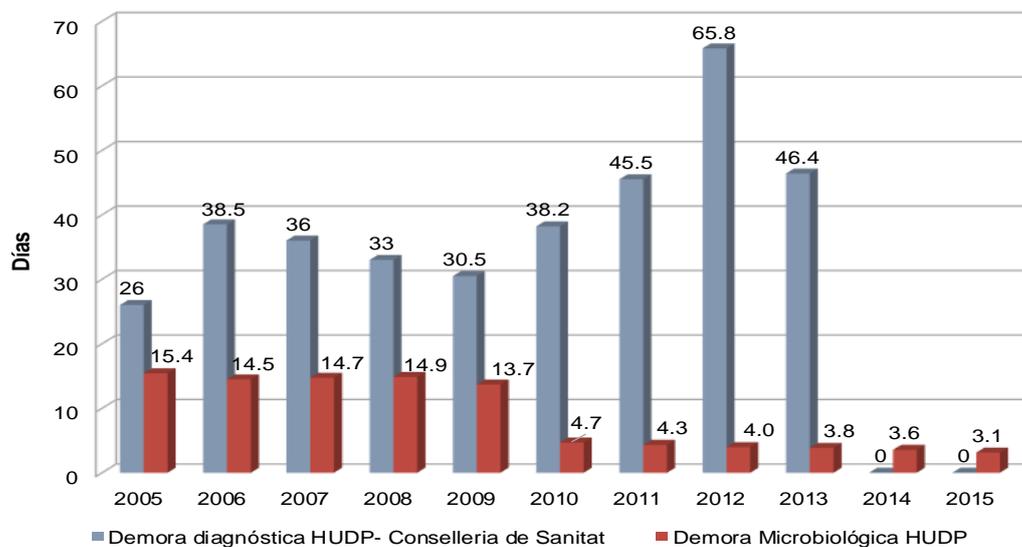
Figura 4.32.- Demora diagnóstica en días en la identificación de MTB en los casos TB de los años 2010- 2015 en el Departamento de Salud HUDr. Peset.



4.7.2.- Demora diagnóstica en TB. Comparación con datos de Conselleria de Sanitat.

Al analizarse los datos obtenidos tras revisión de los Informes de Conselleria para valorar el posible impacto que la disminución en el diagnóstico microbiológico de TB en nuestro medio ha producido en ellos, vemos que no existe correlación entre los mismos.

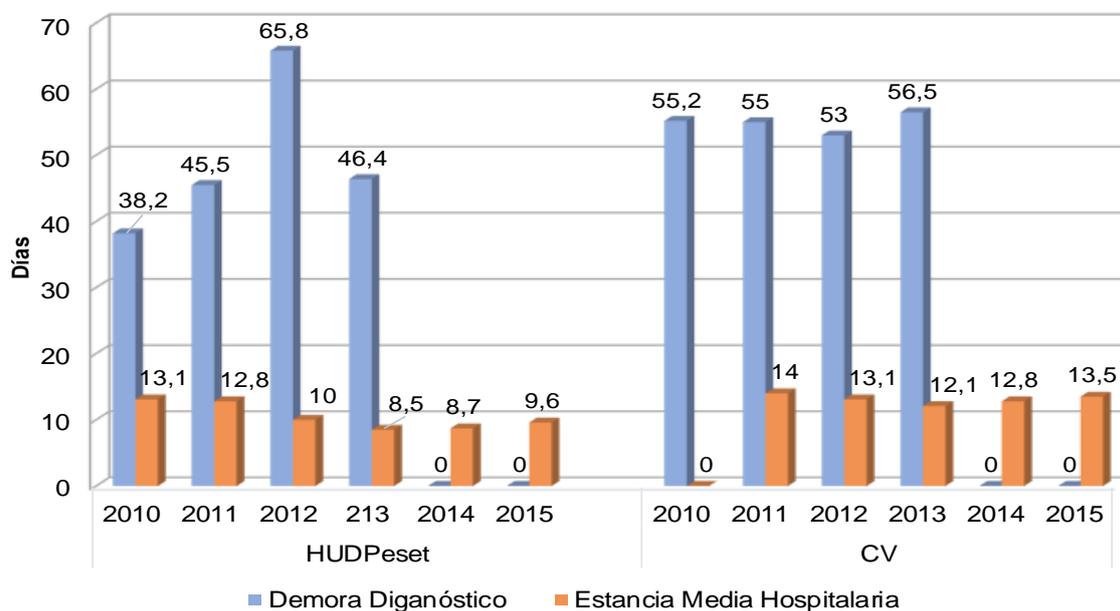
Figura 4.33.- Demora diagnóstica en el HUDr. Peset según datos de Conselleria Sanitat en comparación con la demora diagnóstica microbiológica en el HUDr. Peset^(17,27-31,127).



Las cifras de incremento de demora diagnóstica hasta más de 60 días en 2012 contrastan con la disminución significativa de demora microbiológica en ese periodo a partir de la aplicación de las nuevas técnicas, que debiera haber repercutido sobre los datos oficiales, algo que parece no ocurrir (Figura 4.33).

Al comparar la demora diagnóstica y la estancia media hospitalaria en los últimos 6 años (2010- 2015) se observa que las demoras diagnosticas en nuestro Departamento y Comunitat Valenciana tienen una media de más de 50 días. La disminución de demora microbiológica no parece pues afectar a la demora diagnóstica global de Conselleria, siempre sobre la base de que las variables que se utilizan para su cálculo no son las mismas. Los datos del HUDr. Peset tanto en demora diagnostica como en estancia media hospitalaria se asemejan a los datos de la Comunitat Valenciana publicados en los informes de TB por la Conselleria de Sanitat (Figura 4.34).

Figura 4.34.- Comparación de demora diagnóstica y estancia media hospitalaria en pacientes con TB en el HUDr. Peset y en la Comunitat Valenciana según la Conselleria de Sanitat (17,27-31,127).



5.-Discusión

5.1.- Situación actual de la tuberculosis. Características de la población con TB confirmada en nuestro medio.

A pesar de las distintas medidas de actuación que se han ido aplicando en las últimas décadas para intentar una disminución de su incidencia o incluso plantearse su erradicación, la TB continúa siendo un importante problema de salud pública a nivel mundial, manteniéndose en la actualidad entre una de las enfermedades infecciosas con mayor morbi- mortalidad.

A partir de los programas de control implantados por la OMS, aplicados con niveles variables de eficacia según las características de los países, se han obtenido disminuciones progresivas de incidencia y prevalencia no homogéneas, siendo el descenso más marcado en países desarrollados ⁽⁶⁾. Sin embargo, al estar esta patología relacionada directamente con el nivel socio- económico o grado de pobreza de la población afectada, en los países en vías de desarrollo se han declarado incluso incrementos progresivos de incidencia ⁽¹⁴⁾.

En este trabajo, realizado sobre datos de 2005- 2015 en la población que atiende el Departamento de Salud Valencia- Dr. Peset se detectaron una media de 43 casos/ año, con disminución progresiva mantenida a lo largo del estudio. En el global de los casos con micobacterias el 73,6% fueron MTB, datos algo más elevados que la media en España entre 2008- 2014 o la informada en Europa (61,1%) entre 2008- 2013. Al igual que lo discutido en otros estudios, mientras las MNT aumentaron progresivamente (del 15,4% en 2005 hasta el 46,8% en 2015), disminuyeron los casos de MTB en parte asociado al desarrollo de nuevas técnicas de identificación e incremento de micobacteriosis ^(128,129).

En datos expresados con tasas de incidencia la media fue de 11,6 casos/ 10⁵ habitantes, con disminución progresiva desde un 14,8 inicial en 2005 hasta un 8,8 en 2015. Los últimos datos publicados sobre la vigilancia epidemiológica de la tuberculosis en España en 2015, a partir de los casos notificados a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, muestran una tasa de incidencia de TB en 2015 de 10,6 casos por 100.000 habitantes, un 10% inferior a la del año 2014, asociado a la tendencia descendente y mantenida de las tasas de TBP ⁽¹³⁰⁾.

Al comparar con los datos publicados por Conselleria de Sanitat en Valencia Ciudad y la Comunitat Valenciana, las tasas en general son ligeramente superiores a las obtenidas en nuestro estudio, si bien la tendencia a la disminución progresiva con los años fue similar. No se observan diferencias significativas entre la incidencia de TB en nuestro Departamento de Salud y el resto de los datos de la Comunitat Valenciana. Si comparamos los datos de TB confirmadas en nuestro medio con los datos de los Informes de Salud- TB de la Conselleria de Sanitat de nuestro Departamento si podemos observar pequeñas discrepancias. Éstas son mayores en los primeros años del estudio ya que se van igualando en los últimos años ^(17,27-31,127).

Por comunidades autónomas, tomando datos publicados y/ o casos declarados en los boletines oficiales coinciden, la mayoría, en esa disminución progresiva de incidencia en otras áreas de España. Es el caso de Cataluña donde la tasa de 16,2 por 100.000 habitantes en 2012 supone el quinto descenso anual consecutivo, siendo la cifra más baja desde que se tienen registros. En este informe remarcan la realidad de que la tasa sigue siendo superior a la de países europeos del norte, aunque no de Europa del Este ⁽¹³¹⁾.

En general, al igual que los datos detectados en nuestra zona, en los estudios locales realizados en las distintas áreas geográficas se confirma ese descenso progresivo de incidencia de TB. Dentro de nuestra comunidad, en Castellón se describe una disminución progresiva de casos desde el año 2008 al 2012 ⁽¹³²⁾. Sin embargo, en otra zona de nuestro entorno como Baleares, en un estudio entre 2003- 2011 del Hospital de San Llàtzer, con una tasa de incidencia de TB en 2009 de 17,05/ 10⁵ habitantes superior a la nuestra, informan que la TB es un problema de salud creciente en su entorno a diferencia de lo descrito en la Comunitat Valenciana. En éste trabajo las mayores tasas se asocian a un adecuado estudio de contactos ⁽¹³³⁾.

En Madrid, en un estudio de los últimos diez años en el área del Hospital Universitario de la Princesa, la media de casos/ año desciende de 4,5 en 2001 a 1,7 en 2011 ⁽¹³⁴⁾. En Álava, donde tras tasas que se incrementan desde 12,2 en 2003 al 20,9 en 2006 como pico máximo, descienden luego entre 2007- 2010 ⁽¹³⁵⁾. En Huelva el descenso no empieza hasta 2008, con incidencias que se elevan desde 2003 a 2007⁽¹³⁶⁾.

Por tanto, se puede resumir con todo lo analizado, que en España se describe en general un descenso progresivo de casos/ año y de incidencia de TB, aunque éste descenso empieza en años más recientes y con tasas iniciales más elevadas (20/ 10⁵ habitantes) a las descritas en nuestro medio y en la Comunitat Valenciana, asociado a la implantación en cada zona de las medidas adecuadas en tiempos distintos ⁽¹⁴⁾.

En relación a las variables demográficas edad y sexo, en nuestro trabajo la relación hombre: mujer en TB fue aproximadamente de 2:1, aunque se detectó un incremento ligero estadísticamente no significativo en el porcentaje de casos en mujeres a lo largo del estudio en los últimos años. En la distribución por edades las tasas más elevadas se describen en los intervalos de 25- 34 y 35- 44 años, seguido por el grupo de 45- 54 años y continuando con el de más de 75 años. Solo se detectaron 6 casos de TB en edad pediátrica (1,3%), siendo todos varones. Estos datos coinciden con los publicados a nivel nacional, con un 61% de casos en hombres con edad entre los 35 y 54 años ⁽¹³⁰⁾. Así, en todos los estudios de nuestro entorno^(132,135,136,137,138) se detectan más casos de TB en hombres y en edades comprendidas entre 25- 30 a 45 años y/ o mayores de 65 años.

Nuestras cifras en edades pediátricas son inferiores a otros estudios, como el realizado en el Hospital Miguel Servet de Zaragoza entre el periodo de 2002 a 2014, donde tuvieron un 4,81%, o a la estimación descrita por el ECDC en 2012 que es del 4% ⁽¹³⁹⁾. La Red Española de Estudio de TB Pediátrica describe en un estudio de 2014⁽¹⁴⁰⁾ que la TB pediátrica en España se encuentra estrechamente vinculada a la inmigración y con mayor tasa de formas extrapulmonares y complicadas. En otro trabajo, con datos entre 2014 y 2016 ⁽¹⁴¹⁾ se concluye que la TB infantil sigue vinculada a la inmigración y se mantienen tasas de resistencia a isoniacida menor del 4%.

La relación TB e inmigración en este país se ha descrito como uno de los posibles factores asociados de forma importante en el mantenimiento de los casos. La tasa de extranjeros entre las TB confirmadas en nuestro Departamento de Salud fue cercana al 40%, aunque en nuestro caso no se pudo establecer si se trataba o no de inmigración “reciente”. La mayor proporción de casos de TB entre españoles en nuestro medio se mantuvo a lo largo de todo el periodo analizado. Aunque desde 2005 a 2009 los casos de TB en extranjeros fueron en aumento, en 2012 ocurre una disminución importante de casos, hasta tasas cercanas al inicio del estudio. Comparando esto con

los datos de Conselleria de Sanitat, donde sí reflejan las TB en extranjeros con residencia en España menor a 4 meses, las cifras son muy similares, con una tendencia desde el año 2008 al descenso hasta cifras iniciales. No se observaron por tanto diferencias en las tasas de tuberculosis asociada a inmigración entre lo descrito en nuestro Departamento de Salud con el resto de lo descrito en la Comunitat Valenciana ^(17,27-31,127).

Si se analizan los datos según el país de origen, de los 175 casos de pacientes extranjeros detectados en este trabajo, la mayoría proceden de América del Sur (43%), seguido de África (28%) y Europa (22%). En concreto los países de origen más frecuentes fueron los de la zona central (Bolivia) y noroccidental (Ecuador) en América, Marruecos y parte occidental (Malí y Senegal) en África y Rumania en Europa del Este, mientras que de Asia provienen muy pocos casos (13) siendo los más abundantes de la zona sur (Pakistán).

Las tasas del 40% en inmigración y TB de la Comunitat Valenciana son elevadas respecto a las de otros países europeos, aunque varían según las características de la zona estudiada. En aquellos lugares con mayor inmigración de base, los casos de TB en su población serán más elevadas. En nuestra comunidad se han publicado datos similares a los obtenidos en este trabajo en el Hospital La Fe, donde el grupo de inmigrantes supuso un 53% del total de pacientes con enfermedad tuberculosa confirmada, un 30% procedían de África, un 18% de Asia, un 22% de Europa del Este y un 29% de América del Sur y Centro ⁽¹⁴²⁾.

Los datos en Mallorca ^(133,143) son prácticamente similares a los obtenidos en nuestra zona, con cerca del 40% de TB en inmigrantes de Sudamérica y de África subsahariana y un 10,96% de coinfecciones TB- VIH, mayor incluso que entre la población general. En otras regiones, como Álava ⁽¹³⁵⁾ son superiores, llegando casi al 50% de los casos, o ligeramente inferiores, como en Huelva ⁽¹³⁶⁾ donde, aunque haya un incremento progresivo de TB en inmigrantes, éstos no superan el 30% en los datos de 2011- 2012 que son, a diferencia de nuestro medio, los años con mayor porcentaje de casos. En la zona de Málaga, en un estudio realizado entre 2000- 2011 ⁽¹⁴⁴⁾ sobre TB e inmigración éstos representan en total un 23,2%, cifras inferiores a las nuestras, siendo su origen mayoritario el Magreb y África subsahariana, seguido de lejos por América del Sur y países de Europa del Este. Otros estudios reflejan el mantenimiento

de las tasas de TB en el medio a partir de casos extranjeros, al igual que nuestro caso, y de cómo el origen y el flujo de inmigración depende de la oferta de trabajo, distinto en cada zona analizada ⁽¹⁴⁵⁾.

Otro de los factores estudiados en los pacientes con TB es la detección y cribado de posible **coinfección por TB- VIH**. En los datos globales de nuestro estudio se pudo confirmar coinfección por *M. tuberculosis* complex y VIH en el 10,2%. Sin embargo, el porcentaje de casos sin datos de VIH fue casi del 30%, datos similares aparecen en el trabajo de Cano-Portero donde se describe que el estatus conocido de VIH es del 63% de los casos, de los cuales el 7% fueron VIH positivos ⁽¹³⁰⁾, lo que debería resultar como “no aceptable” si se parte de que la TB es una de las enfermedades en diagnóstico de SIDA. Algo similar se describe en un estudio publicado en 2013 respecto a TB en inmigrantes africanos en la zona de Sabadell ⁽¹⁴⁶⁾ donde la tasa de TB en inmigrantes fue de 11,4%, de los que un 30% eran africanos, no habiéndose realizado el cribado de infección por VIH en más del 30% de los casos. A pesar de ello, la petición de estudio de anticuerpos anti- VIH en TB no se ha implantado homogéneamente en nuestro medio como prueba a determinar ante toda TB ⁽¹³⁾.

En un estudio realizado a nivel nacional entre los años 2001 y 2011, el 15,9% tenía coinfección TB- VIH, siendo el 78,6% de los coinfectados varones. La edad media de los pacientes coinfectados fue 8 años inferior a la de los pacientes que sólo presentaban TB. A lo largo de estos 11 años el porcentaje de pacientes coinfectados fue disminuyendo, pasando de un 19,8% en el 2001 a 10,7% en el año 2011 ⁽¹⁴⁷⁾. Algo similar se describe en lo publicado por la Conselleria de Sanitat respecto a nuestro Departamento de Salud. Analizando los datos oficiales globales de la Comunitat Valenciana con pacientes TB- VIH positivos se describe una disminución progresiva con los años ^(17,27-31,127).

Por grupos de edad y sexo la distribución en estos pacientes mostró mayor incidencia en el intervalo de edad de 25- 44 años, destacando en nuestro medio la ausencia de casos de coinfección TB- VIH en edad pediátrica y en mayores de 65 años a lo largo de los once años del estudio, lo que implica una distinta distribución que la descrita en TB no VIH.

Esta variabilidad de coinfección TB- VIH entre los distintos estudios publicados y su comparación con los datos en zonas como la nuestra, donde se ha realizado una búsqueda activa de casos VIH sobre cada TB diagnosticada, muestra realidades distintas en función no ya del tipo de población analizada sino también de la correcta determinación de Ac anti- VIH. Así distintas publicaciones en zonas de España en este periodo coinciden con tasas de coinfección TB- VIH entre el 9% y más del 11%^(133,148,149) sin diferencias entre población autóctona o inmigrante. En nuestro Departamento de Salud sí encontramos diferencias, ya que de los 48 casos detectados aproximadamente un 63% fueron casos autóctonos. Es similar a lo descrito en otros trabajos donde se incide en que en ocasiones la TB es inferior en inmigrantes, con una tendencia al descenso con los años ⁽¹³⁶⁾.

Así pues se podría concluir en que la coinfección TB- VIH asociada a la variable nacionalidad del paciente es un dato variable entre áreas y tipo de estudio, ya que como ocurre en el trabajo realizado en el área del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza ⁽¹⁵⁰⁾ sobre población joven y con un 30,3% de inmigración procedente mayoritariamente de Rumania, Marruecos, Ecuador y Senegal, la tasa de coinfección TB- VIH llega casi al 30%, de los que un 17% eran inmigrantes, destacando en este caso la elevada tasa de coinfección en los pacientes procedentes de África (más del 50%) y América del Sur (más del 30%).

La variable localización TB pulmonar vs. TB extrapulmonar en nuestro estudio muestra un porcentaje de aproximadamente un 80% a favor de la primera, al igual que en la mayoría de los trabajos. Dentro de las TB extrapulmonares la localización pleural es la mayoritaria (7,5%), seguida de la linfática (3,4%), sumando intratorácica y extratorácica, y la menos frecuente es la digestiva/ peritoneal (0,2%). Estos datos son similares a los de otros trabajos sobre poblaciones en distintas provincias españolas ^(132,136,148,151,152). En concreto, en el caso del Hospital La Fe de Valencia se describen datos similares, con el 71% de TB pulmonar, 10% linfadenitis, 6% pleural y tan sólo un caso de TB digestiva ⁽¹⁴²⁾.

Estos datos son dependientes del tipo de población afectada en cada área, tal como se confirma en los distintos estudios realizados ^(132,136,148,151,152,153). Las formas de presentación más frecuentes de TBEP descritas varían según trabajos en TB ganglionar, TB diseminada y en general con una tendencia ascendente sobre todo en

los últimos diez años asociada a inmunodeficiencias y a inmigración. Por tanto, parece lógico pensar que, aunque la forma de presentación habitual es mayoritariamente pulmonar, cuando se estudian poblaciones distintas con factores de riesgo específicos debemos prever una mayor frecuencia de formas de presentación extrapulmonar.

Si se estudia el **origen o procedencia de las muestras para el diagnóstico clínico de TB**, en nuestro caso más de la mitad de los casos fueron diagnosticados a partir de muestras remitidas de pacientes que llegan para una valoración desde Urgencias Médicas del Hospital (52,5%), o desde el Servicio de Neumología, a partir de los ingresos desde puertas al Servicio de Neumología o de Consultas Externas. Una décima parte de los diagnósticos de la TB se realizó desde Medicina Interna que incluye la Unidad de Enfermedades Infecciosas (8%). El 3% de los casos se realizó desde peticiones directas de Atención Primaria.

El control posterior de estos casos quedó a cargo del Servicio de Neumología y del Servicio de Medicina Interna- UEI en prácticamente el 90% de los pacientes. Un porcentaje bajo de pacientes, que al inicio no fueron adecuadamente controlados al ser baciloscopia negativa sin petición de PCR, se derivaron desde Urgencias a control por su MAP.

La detección de casos desde los Servicios de Urgencias y su control posterior por el Servicio de Neumología o Medicina Interna en las TB en VIH positivos parece lógica. Sin embargo, no se valora de forma explícita en demasiados trabajos locales, si bien, sí se indica el problema del infradiagnóstico desde Atención Primaria y la pérdida de casos, en especial asociada a pacientes VIH positivos. Un ejemplo es el estudio realizado en el trabajo del Hospital San Pedro de la Rioja donde se refleja, al igual que en el nuestro, que los enfermos se diagnostican en casi un 75% desde el Servicio de Urgencias, a pesar de que en muchos casos no había sospecha inicial, retrasando así el aislamiento del enfermo como medida clave para prevenir la transmisión, además de confirmar que en una cuarta parte de los casos no se solicitó estudio serológico para detección de VIH ⁽¹⁵⁴⁾.

5.2.- Papel del laboratorio de microbiología en la confirmación de los casos de TB, detección de resistencias y disminución de la demora diagnóstica.

5.2.1.- Eficacia de las técnicas actuales en el diagnóstico precoz y confirmación de TB.

El Servicio de Microbiología, cuando actúa como lugar de referencia de un Departamento de Salud, donde se pueden centralizar los diagnósticos de confirmación de la TB, es el lugar indicado desde donde plantear, a partir de sus datos y pautas concretas, un adecuado control de la TB en esa zona ^(11,58). En el laboratorio es donde se realiza la detección de pacientes bacilíferos, el aislamiento e identificación de MTB a nivel de especie e incluso, dependiendo del nivel de bioseguridad del laboratorio, los estudios de sensibilidad para detección y control de casos multirresistentes.

Clásicamente el diagnóstico en el laboratorio de la TB ha sido un problema por la demora en el crecimiento de esta bacteria en los medios sólidos de LJ, al ser un microorganismo de crecimiento lento, con medias que superan las 3- 4 semanas, o incluso más si luego se aplican los métodos de identificación convencional con pruebas de identificación bioquímica. Cualquier pauta actual debe superar estos problemas de lentitud diagnóstica, existiendo numerosas alternativas que se aplican de forma rutinaria en los laboratorios de micobacterias que tienen como función básica mejorar la “precocidad” en la detección y diagnóstico de confirmación microbiológica del caso y de posible resistencia ⁽¹⁵⁾. Tomando como objetivo principal el diagnóstico precoz de infección- enfermedad tuberculosa, aun así, el aislamiento de la cepa en cultivo se sigue considerando el método de referencia de diagnóstico de TB por su sensibilidad y eficacia en la obtención de masa bacteriana para estudios posteriores ^(24,57).

A pesar de los interesantes avances técnicos en los métodos a aplicar en el diagnóstico microbiológico de la TB la **baciloscoopia** se sigue contemplando como el procedimiento más rápido, simple y económico, ya que nos puede proporcionar un diagnóstico presuntivo tras realización de una tinción de ZN o similar a la muestra del paciente ⁽⁶⁰⁾, permitiendo identificar los casos de pacientes BAAR positivos que son los que mantienen la cadena epidemiológica de transmisión de la enfermedad. Si en la baciloscoopia se aplica además un sistema de “cuantificación” de positividad de los BAAR, ésta sirve como método adecuado para control de eficacia de tratamiento

específico del paciente tras su diagnóstico e instauración de pauta de tratamiento ⁽⁶¹⁾. El alcanzar una cobertura del 100% de detección de posibles bacilíferos sería lo deseable, al igual que ha ocurrido en nuestro trabajo, pero no siempre resulta posible⁽¹³⁵⁾.

En distintos estudios se muestran porcentajes de sensibilidad de baciloscopia variables, debiendo valorar los factores que en ello puedan influir. La rentabilidad de la baciloscopia varía en base al tipo de muestra, siendo lógicamente superior en patología pulmonar ^(62,86) y dependiente del tipo de paciente, donde coinfección TB- VIH se asocia con disminución de sensibilidad de la técnica ⁽⁵⁷⁾. En nuestro estudio la rentabilidad de la baciloscopia en TB extrapulmonar disminuye, al igual que en todos los trabajos revisados al respecto, como se describe en un análisis de casos de TBEP realizado en Navarra entre 2000- 2009, donde sólo el 16,7% presentan BAAR positiva, incluso sin asociación a coinfección VIH ⁽¹⁵⁵⁾ o en otro estudio realizado en Castellón entre los años 2008 a 2012 donde solo el 19,8% de baciloscopias eran positivas en TBEP ⁽¹⁵⁶⁾. En un estudio realizado en Murcia la proporción de tuberculosis con baciloscopia positiva en secreciones respiratorias fue del 51% ⁽¹⁴⁸⁾. En nuestro estudio la rentabilidad global de la baciloscopia fue prácticamente del 50%, aumentando en los casos de TB pulmonar y detectándose diferencias estadísticamente significativas al comparar con su rentabilidad en casos extrapulmonares.

La variable VIH también mostró diferencias significativas, con menos del 40% de BAAR positivas en TB- VIH positivos vs. casi un 60% en los TB- VIH negativos, diferencias que se incrementan más aún si se compara TB pulmonar vs. TB extrapulmonar en este grupo de pacientes. En la Rioja en los pacientes estudiados entre 2007- 2012 ⁽¹⁵³⁾ en el 83% de los casos de TB confirmados se consiguió una rentabilidad global de la baciloscopia, utilizando la tinción de auramina- rodamina, de más del 45%, datos que resumen la media habitual informada en la mayoría de trabajos de nuestro entorno.

Un problema añadido a la hora de valorar los datos de incidencia de TB y la rentabilidad de la baciloscopia es el poder comparar los datos publicados desde cada Departamento de Salud o área de trabajo. Así, si se analizan los datos de TB confirmados en el Departamento de Salud Valencia- Dr. Peset estudiados en estos once años estos son difícilmente comparables por cambios en la asignación de

población del área sanitaria. Estas discrepancias entre tasa de incidencia de los Informes de Conselleria y las tasas obtenidas desde Microbiología van disminuyendo en los últimos años ^(17,27-31,127). Es un marcador que nos podría indicar que cuando se implanta la metodología adecuada el diagnóstico microbiológico cada vez se acerca más a los casos declarados. Así, los datos de los últimos años nos confirman que al menos en nuestra área la aplicación y valoración por parte de la Conselleria y de la RedMiva está ayudando a acercar la realidad microbiológica a los datos que desde los organismos oficiales se nos informan.

El cultivo de la muestra clínica en medios adecuados sigue considerándose método de referencia para el diagnóstico de confirmación de la TB. En un reciente trabajo sobre el diagnóstico microbiológico de las infecciones causada por *Mycobacterium* spp. Samper *et al.* mantienen que el cultivo de micobacterias es la prueba de referencia en el diagnóstico de la tuberculosis y de las MNT, aunque en ocasiones se requiera al menos 2- 3 semanas ⁽¹⁵⁷⁾. Su introducción en la rutina diagnóstica de TB, tanto en baciloscopias positivas para confirmación de especie y estudios de sensibilidad, como en las negativas por la sensibilidad de la tinción, es una práctica obligada y realizada en nuestro medio y en todos los laboratorios de nuestro entorno.

La necesidad de confirmación tras cultivo de la especie de micobacteria ha sido clásicamente un inconveniente, debido a la lentitud y al tiempo de demora que supone el crecimiento de la cepa ⁽⁶⁴⁾, por lo que para disminuir el tiempo de diagnóstico de certeza y de estudio de sensibilidad y siguiendo criterios de la OMS en las pautas actuales se utiliza la combinación de siembra en medio sólido junto con medios líquidos enriquecidos incubados en sistemas automatizados ⁽⁶⁵⁾.

En este trabajo se incluye como pauta la utilización de LJ junto con cultivos en medio de MGIT en sistema automatizado BACTEC MGIT 960. Ante la positividad del MGIT incubado en el sistema automatizado se confirma la presencia de BAAR tras tinción de ZN y observación al microscopio óptico de producción de “cord factor”, pasando a detectar la presencia de *M. tuberculosis* complex por los métodos indicados en el apartado correspondiente del trabajo. La utilización de la técnica de auramina vs. ZN se ha informado incluso en ocasiones como más eficaz ⁽¹⁵⁸⁾ y aunque no existe consenso respecto a esta afirmación no podemos ajustar al respecto ya que no está

introducida en la rutina de nuestro trabajo.

Esta pauta proporciona la rapidez necesaria para disminuir la demora en el crecimiento sin afectar a la sensibilidad de la misma, dato objetivado en nuestro trabajo con una media de 23,2 días en LJ vs. 14,2 en MGIT que se mantiene en el tiempo y se modifica en función del tipo de muestra y resultado de la baciloscopia. La positividad en medios líquidos en nuestro trabajo fue de 14,2 días de media en MGIT a nivel global y disminuyó a 9,5 días en muestras de esputos con BAAR positiva. Esto ha sido ampliamente documentado en numerosos trabajos ^(10,12,97,159). Así, en la actualidad, la pauta adecuada ante sospecha de TB debe incluir el cultivo en medios líquidos en sistemas automatizados de incubación y lectura en los que además se puedan realizar pruebas de sensibilidad “in vitro” a los antimicrobianos ⁽¹⁵⁸⁾. Este mejor rendimiento de los cultivos líquidos automatizados también se describe, entre otros, donde también es baciloscopia dependiente ⁽¹⁵⁷⁾.

En la rutina habitual de los laboratorios de microbiología de nuestro entorno la utilización de esta misma metodología es lo habitual, al ser lo recomendado en los protocolos de la SEIMC ⁽²⁾. El sistema automatizado es verdad que puede variar entre el utilizado en nuestro laboratorio, BACTEC MGIT BD[®], o bien el de otros hospitales que trabajan con el sistema MB/ BacT Alert (BioMérieux). El añadir o no un medio sólido a estos medios líquidos, tal como aconseja la OMS, ha sido analizado recientemente en un estudio en Alzira en el que los autores concluyen que el utilizar solo medio líquido supone un ahorro importante, aunque sería necesario profundizar en análisis de coste- eficacia para poder reforzar esta afirmación ⁽¹⁶⁰⁾, algo que no era objetivo de nuestro trabajo.

La identificación de MTB se realiza clásicamente estudiando las características físicas de crecimiento en LJ y pruebas bioquímicas sobre cultivo, como son la producción de niacina, catalasa termoresistente y reducción de nitratos a partir de la masa tras crecimiento. Ello supone un subcultivo de las cepas a medios sólidos, demorando el diagnóstico de especie en ocasiones hasta varias semanas ^(11,59). La necesidad de disminuir esta demora para un correcto y rápido control de TB ha hecho que en los últimos años la identificación haya pasado a métodos comerciales basados bien en sondas de hibridación o en la actualidad a métodos de PCR- hibridación ⁽⁷³⁾ y/o técnicas de inmunocromatografía (IC) que detectan el antígeno MPT64 secretado

específicamente por el complejo *M. tuberculosis* durante el crecimiento en el cultivo líquido ⁽⁶⁵⁾. La totalidad de trabajos actuales al respecto aplican estos métodos moleculares, mostrando cifras de sensibilidad variables según publicación y tipo de muestras utilizadas ^(18,65,75,161).

En este trabajo se aplicó en su inicio, entre los años 2005- 2009, la confirmación de especie mediante sistemas de hibridación con sondas específicas, siendo a partir de 2010 cuando se pudo empezar a utilizar una técnica de inmunocromatografía desde MGIT para detección de Ag secretado MPT64 que confirma MTB de forma rápida (15 minutos). La introducción de una técnica de IC, sobre medio con antígeno secretado, por su rapidez, sencillez de realización y elevada sensibilidad y especificidad de MTB, ha supuesto una mejora notable en la eficacia del diagnóstico de presencia de MTB en nuestro medio, tal como se describe en la mayoría de trabajos a nivel mundial. Ello ha supuesto una mejora notable en la eficacia del diagnóstico de presencia de MTB en nuestro medio, tal como opinan la mayoría de trabajos a nivel mundial que estudian la utilidad de esta técnica en el diagnóstico de TB ^(18,58,59,65,161).

La identificación del tipo de especie dentro del “complejo tuberculosis” se realizó de forma seleccionada sobre 55 aislados, descongelando las cepas y aplicando una técnica de PCR hibridación reversa (GenoType MTBC- HAIN LifeScience®). Se confirmó el aislamiento de tres casos de *Mycobacterium africanum*, un caso de *Mycobacterium bovis subespecie bovis* y un caso de *Mycobacterium bovis* BCG, siendo el resto casos de *M. tuberculosis*. Otros estudios como el de Safianowska *et al.* ⁽¹⁶²⁾ corroboran que el ensayo GenoType es un buen método para la identificación en rutina de las especies del complejo de *M. tuberculosis*, obteniendo una sensibilidad del 93,2% y especificidad del 100% cuando se usa el GenoType MTBC, incluso directamente desde muestras clínicas con baciloscopia positiva. Otros trabajos que apoyan estos resultados ^(163,164).

A la hora de llegar a un diagnóstico etiológico que confirme una TB mediante técnicas microbiológicas, además de la positividad inicial de la baciloscopia y su papel ya comentado y de los avances en el aislamiento e identificación de la cepa aislada, se está utilizando de forma cada vez más habitual en los últimos años los métodos moleculares de amplificación de ácidos nucleicos, que detectan la presencia de ácido nucleico de *M. tuberculosis* complex directamente de la muestra ⁽¹⁶⁵⁾. Si uno de los

objetivos básicos para un adecuado control de la TB pasa por la detección de los pacientes bacilíferos y disminución del tiempo diagnóstico aplicando las técnicas referidas, la introducción en la rutina del laboratorio de microbiología de técnicas de PCR en tiempo real a partir de la muestra clínica y ver si esta metodología responde a las expectativas creadas, es una de las preguntas cuya respuesta afirmativa podría suponer un cambio importante en el cómo hacer ante la sospecha de TB ^(56,59).

5.2.2.- Detección y control de cepas de *M. tuberculosis* complex resistentes.

Resistencias fenotípicas.

Un adecuado control de la TB debe incluir, además de los puntos previamente comentados respecto a mejora diagnóstica, rapidez y sencillez de las técnicas para un diagnóstico precoz, la detección de casos resistentes a los tuberculostáticos, en especial a los de primera línea. Ello incluye detección rápida de resistencia a rifampicina mediante RT- PCR desde muestra clínica directa y detección de cepas multirresistentes (MDR-TB) y de posibles cepas XDR-TB. Aunque este problema parece no afectar a nuestro entorno, sin embargo, la ausencia de datos oficiales sí que obliga a mejorar los mecanismos de detección y declaración de los mismos para cumplir con el objetivo del adecuado control de esta enfermedad.

Las pautas microbiológicas de estudio de sensibilidad, una vez prácticamente abandonado el método de las proporciones de Canetti ⁽⁷⁰⁾ en medio sólido de LJ, por la elevada demora que conlleva la obtención de resultados (entre 28- 45 días), se basan en la actualidad en la aplicación de sistemas automatizados en medio líquido. Entre estos el sistema MGIT 960 SIRE- P es el habitualmente implantado en la mayoría de los laboratorios de micobacterias en nuestro entorno. En él se determina la sensibilidad a SIRE- P, fármacos de primera línea en el tratamiento de la TB, de forma estandarizada y validada para distintas concentraciones, pudiendo clasificar a la cepa implicada en el proceso como sensible o resistente a cada uno de estos fármacos ensayados. En nuestro caso, a lo largo de los 11 años y utilizando esta metodología se ha realizado el estudio de sensibilidad a la totalidad de los 469 casos confirmados de TB, en muchos de ellos no solo a la cepa inicial del caso sino también a cepas posteriores con cultivos positivos tras control bacteriológico por posibles fallos

terapéuticos o aparición de más de un episodio en algunos de los pacientes a lo largo de los años por reinfección y/ o recidiva.

El 12,6% (59 pacientes) de las TB estudiadas fueron resistentes a 1 o más fármacos de primera línea, mostrando, en su evolución a lo largo del estudio una tendencia de disminución progresiva, que pasa del 18,2% en 2005 al 6,3% en 2014, con dos picos en 2010 (20,5%) y 2015 (20%). En 41 casos la resistencia mostrada fue a 1 sólo fármaco, de los que 25 lo eran a estreptomycin, 13 a isoniacida y 3 a pirazinamida. No se detectaron casos de cepas con resistencia aislada a rifampicina ni a etambutol.

Los 18 casos restantes fueron de cepas con resistencia asociada a dos o más fármacos, de los que 9 correspondieron a cepas MDR-TB (que incluía pues isoniacida y rifampicina) lo que supone en nuestro medio menos de un 2% de los casos. El 6% de casos mostró resistencia fenotípica a isoniacida, siendo menores las resistencias a rifampicina, etambutol o pirazinamida

El tipo de resistencia (primaria o secundaria) no se pudo establecer por falta de datos para clasificar en cada grupo, algo habitual en la mayoría de los trabajos al respecto. La incidencia de cepas MDR-TB en nuestro medio fue relativamente baja, inferior al (2%) sin diferencias significativas por años, edad o tipo de TB del paciente. No se detectaron diferencias significativas tampoco en función de la nacionalidad del paciente ni se asociaron éstas a coinfección por VIH.

En los resultados publicados de resistencias por los distintos grupos de estudio en España se muestran datos que oscilan poco de lo detectado en nuestro medio. En general las tasas de resistencias en las distintas regiones de este país son similares o incluso inferiores a las obtenidas en este estudio, aunque en algunas ocasiones se describen tasas ligeramente superiores ⁽¹⁵¹⁾. Así, se detecta resistencia a H y R (cepas MDR-TB) en el 0,8% de aislados entre 2003- 2011 en Mallorca ⁽¹³³⁾, el 1,6% en Madrid entre 2001- 2011 ⁽¹³⁴⁾, el 1,8% entre 2010- 2013 en Murcia ⁽¹³⁷⁾, el 1,23% en el Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza ⁽¹⁶⁶⁾, o el 0,4% Guipúzcoa en este caso en un estudio realizado a lo largo 16 años ⁽¹⁶⁷⁾. Existe una excepción con un estudio realizado en Castellón donde no se sigue esta tendencia de unos valores bajos de cepas MDR-TB, sino que su porcentaje de cepas MDR-TB es de 17,1% ⁽¹³²⁾.

Al estudiar la posible asociación de resistencia con inmigración vemos que en algunos trabajos los porcentajes de resistencia en pacientes nacidos en el Magreb, Europa del Este y Sudamérica muestran cifras más bajas que las observadas sobre población autóctona en Málaga entre 2000- 2011 ⁽¹⁴⁴⁾. En el caso del estudio sobre población africana en Sabadell ⁽¹⁴⁶⁾ se muestra también que la resistencia a tuberculostáticos es inferior en africanos que en españoles. Sin embargo, en el Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza ⁽¹⁵⁰⁾ en el estudio realizado entre 2000- 2009 sobre TB en el área detectan mayor número de TB resistentes a fármacos en inmigrantes (10,2%) que en autóctonos (5,9%).

El mayor porcentaje de resistencias en extranjeros que residen en España frente autóctonos es lo que se detecta en Pamplona ⁽¹⁵¹⁾ en un estudio retrospectivo entre los años 2000- 2008, donde el 7,2% de resistencia a H muestra diferencias significativas entre extranjeros (19,2%) y españoles (1,7%), al igual que ocurre en el caso de R y E o incluso en cepas MDR-TB (7,7% en extranjeros y ausencia entre españoles de la zona) o en el trabajo de Bermúdez *et al.* con diferencias significativas a favor de la población inmigrante (16% de Europa del Este, 8,5% de Sudamérica o 6,7% del Magreb) ⁽¹⁴⁴⁾.

En nuestro trabajo se ha podido demostrar que no hay ningún tipo de asociación de resistencias con los factores de edad, sexo, nacionalidad, coinfección TB- VIH ni tipo de TB, al igual como se demuestra en un trabajo realizado en el Hospital Reina Sofía de Murcia describiéndose como variables independientes la nacionalidad, la coinfección con VIH y el tratamiento antituberculoso previo donde ninguna de ellas presentó una asociación significativa con resistencia ⁽¹³⁷⁾.

En el caso de resistencias aisladas a los principales fármacos los datos también varían entre grupos de población, aunque están en la misma línea que lo detectado en este trabajo. Resistencias por encima del 5% en un tuberculostático son cifras a tener presentes a la hora de establecer posibles modificaciones de las pautas a aplicar. En nuestro medio solo la isoniacida (8,1%) presentó una incidencia elevada, similar a otros trabajos con cifras de 7,6%, 7,2% o 7,5% de otras zonas del entorno ^(132,134,151). En otros estudios sin embargo se demuestra una resistencia a fármacos de primera línea baja detectándose una resistencia con isoniacida de 3,9%, con 0,6% a rifampicina, a estreptomycinina de 1,7%, 0,2% a etambutol y 3,5% a pirazinamida ⁽¹⁶⁷⁾.

Se puede por tanto pensar, valorando todos los datos comentados obtenidos de los distintos trabajos en la población de España respecto a MDR-TB, que las diferencias en cuanto a resistencias no son significativas, si bien cada trabajo encuentra cifras variables según el tipo de población y las características del área estudiada. Nuestros datos no difieren de esta dinámica. Aunque, el baile de cifras y posibles discrepancias de resultados observados al leer la bibliografía al respecto, la idea prácticamente consensuada en nuestro medio es que la tasa de resistencias de MTB a los tuberculostáticos de primera línea es en general baja, con excepciones concretas. Las resistencias a isoniacida superan el 5% en la mayoría de zonas, asociadas o no a inmigración ⁽²³⁾, pero la comparación de datos para valorar de forma más clara esta variable está limitada por el origen y falta de pautas a la hora de emitir datos oficiales fiables al respecto ^(168,169). Es la valoración parcial de los distintos trabajos lo que nos indica una aproximación a los posibles datos reales.

Detección genotípica de resistencias por métodos moleculares convencionales.

De los casos MDR-TB estudiados, tan solo dos fueron TB extrapulmonar, siendo el resto TB pulmonar. Se detectaron 4 pacientes extranjeros y tan solo en uno VIH positivo. En tres pacientes la baciloscopia fue negativa, pero al introducir en 2010 la detección de ADN de *M. tuberculosis* complex mediante GeneXpert MTB/ RIF se pudo confirmar la resistencia a rifampicina, consiguiéndose con ello una demora menor de 24 horas en el diagnóstico y aislamiento de MDR-TB. Esta notable ventaja en la detección rápida de estos casos se describe también en la bibliografía al respecto ^(11,15,72,93).

Es un tema que se está revisando también en nuestro entorno en un estudio presentado en el congreso de la SEIMC 2012 por Martín- Diaz ⁽¹⁷⁰⁾ y ampliado en 2013⁽¹⁷¹⁾ informa del aumento de aislados de MTB resistentes a rifampicina, pero sensibles a isoniacida. Según el estudio de Kurbatova *et al.* el porcentaje de estas cepas varía por áreas. Eso puede ser debido a que en zonas de prevalencia alta de MDR-TB el porcentaje de aislados sensibles a isoniacida disminuye. Estos resultados cuestionan el empleo de la resistencia a rifampicina como marcador de multirresistencia, sobre todo en áreas de prevalencia baja de MDR-TB ^(171,172).

En nuestro caso, al igual que lo hasta ahora descrito por la mayoría de los

autores en nuestro medio y entorno, se considera la resistencia a rifampicina como un “predictor” de resistencia a isoniacida. Partiendo de esta premisa la detección de mutaciones a rifampicina mediante el sistema de PCR en tiempo real GeneXpert MTB/RIF alertaría, mientras no se demuestre lo contrario, de posible resistencia a isoniacida de la cepa implicada en el proceso. Sin embargo, en el trabajo mencionado realizado en el Hospital Universitario de Getafe se concluye que el hallazgo por su parte en los últimos años (2007- 2011) de TB resistente a rifampicina, pero sensible a isoniacida reflejaría la emergencia de un nuevo patrón de sensibilidad, cuestionando así el empleo del uso de resistencia a rifampicina como marcador de multirresistencia ⁽¹⁷⁰⁾. En nuestro caso, sin embargo, todas las cepas resistentes a R lo son a H, no habiéndose descrito este tipo de clon, lo que nos obliga a mantener los sistemas de alerta necesarios para detectar su posible aparición.

Se debe prestar especial atención a los pacientes con TB extrapulmonar con cepas multirresistentes, utilizando como método rutinario el GenoType MTBDR^{plus} para reducir sustancialmente el tiempo entre el diagnóstico y terapia ⁽¹⁷³⁾. La utilización de métodos de detección por PCR- hibridación de las mutaciones más frecuentes implicadas en la resistencia a isoniacida y rifampicina y de técnicas de PCR en tiempo real de resistencia a rifampicina suponen un gran avance en el diagnóstico y control de la TB. La detección rápida de cepas con alguna resistencia a fármacos de primera línea garantiza un tratamiento adecuado, reduciendo la morbi- mortalidad, costes económicos, transmisión de la infección y propagación de cepas multirresistentes ⁽¹⁷⁴⁾.

Para la confirmación genotípica de resistencias a fármacos de primera línea, a partir de cultivo o incluso para detección directa desde muestra clínica, se están aplicando en la actualidad cada vez más los métodos moleculares que detectan mutaciones en genes específicos de *M. tuberculosis* complex (gen *rpoB* en rifampicina o genes *katG* y/ o en la región intergénica *mab- inhA* para isoniacida) ^(165,175,176). Entre los distintos métodos disponibles para ello, en este estudio se aplicaron los habitualmente utilizados por la mayoría de laboratorios de micobacterias. Son aquellos basados en la detección de mutaciones tras PCR- hibridación reversa y la PCR en tiempo real para detección de mutaciones de resistencia a rifampicina, generalmente asociada en nuestro medio a resistencia a isoniacida. Este último se aplica directamente sobre muestras con baciloscopia positiva o incluso negativa cuando existe elevada sospecha clínica ⁽¹⁰⁰⁾.

La detección de mutaciones en los genes *rpoB*, *katG* y/ o *inhA* por hibridación reversa sobre membrana de nitrocelulosa hibridada con amplicones de MTB, se realiza con el kit comercial MTBDR_{plus} (HAIN LifeScience®). El GenoType MTBDR_{plus} es una técnica que ofrece buenos resultados. Aunque es una técnica para la detección rápida de las MDR-TB, todavía no puede detectar todas las mutaciones implicadas ⁽¹⁷⁷⁾.

En el GenoType MTBDR_{plus} aparecen ocho sondas de tipo salvaje (WT1 a WT8) abarcando la región del gen *rpoB* que codifica los aminoácidos 505 a 534 y cuatro sondas específicas para las mutaciones más comunes: D516V, H526Y, H516D y S531L (*rpoB* MUT1, MUT2A, MUT2B y MUT3, respectivamente). Para el gen *katG* hay tres sondas específicas en la región del codón 315, una es la sonda salvaje (*katG* WT) mientras que las otras dos (*katG* MUT1 y MUT2) están diseñadas para la mutación AGC a ACC (S315T) y el AGC a ACA (S315T2). Además de seis sondas diseñadas para la región del promotor *inhA* (8,15 y 16 del gen *inhA*), siendo dos sondas de tipo salvaje (*inhA* WT1 y WT2) y otras cuatro (*inhA* MUT1, MUT2, MUT3A y MUT3B) detectando mutaciones en C15T, A16G, T8C, y T8A, respectivamente ⁽⁹³⁾.

En las cepas multirresistentes estudiadas en nuestro trabajo, a pesar de los pocos casos detectados, observamos que el patrón de bandas mayoritario fue el de ausencia de WT8 y mutación MUT3 (S531L) en *rpoB* y el de ausencia de WT y mutación MUT1 (S315T1) en *katG*. El resto de patrones MDR-TB tan solo aparecen una vez.

Las mutaciones detectadas en las cepas estudiadas corresponden a las habituales descritas en la bibliografía por otros autores en varios estudios, como en el estudio realizado por Crudu *et al.*, donde describe que las mutaciones más relevantes son en la posición S531L en *rpoB*, encontrada en el 86,8% de los casos, seguido por las mutaciones en las posiciones D516V o H526Y encontradas en un 4,4% y 0,9% de los casos, respectivamente. La mutación más frecuente en *katG* fue S315T1 con un 94,8% y en *inhA* en C15T con un 52,6% ⁽⁹³⁾. Al igual que en el estudio realizado por Shinghal *et al.* en el que la mutación más común fue S531L en *rpoB* (58,2%), seguida de D516V (8%), H526Y (5%) y H526D (1,3%), y entre las cepas resistentes a isoniacida la mutación predominante fue S315T1, que se encontró en un 88,3% de las cepas resistentes ⁽⁹⁴⁾. Otro trabajo realizado, en el que se describen patrones similares, es el realizado por Kumari *et al.*, apareciendo como más frecuente en *rpoB* la banda MUT3

(S531L) y en menor frecuencia la mutación MUT1 (D516V), y en *katG* la mutación predominante detectada en todas las cepas fue la mutación MUT1 (S315T1) ⁽¹⁷³⁾. Otro autor que describe casi los mismos patrones observados en nuestro estudio fue Lu *et al.* donde fueron en *rpoB* ausencia de WT8 + banda MUT3, en *katG* ausencia de WT + banda MUT1, y en *inhA* ausencia de WT1 + banda MUT1 ⁽¹⁷⁸⁾.

A nivel mundial, el 64% de la resistencia fenotípica observada a la isoniacida se asoció en la mutación *katG* (S315T) y la segunda mutación más frecuentemente observada fue *inhA*- 15. Estas dos mutaciones, *katG* 315 e *inhA*- 15, combinado con diez de las mutaciones más frecuentes en el promotor *inhA* y la región intergénica *ahpC*- *oxyR* explica el 84% de la resistencia fenotípica global a la isoniacida ⁽¹⁷⁹⁾.

Para la confirmación genotípica de resistencias a fármacos de segunda línea, a partir de cultivo o incluso para detección directa desde muestra clínica, utilizamos los kits comerciales MTBDRs/ V.1.0 y MTBDRs/ V.2.0. La tira MTBDRs/ V.1.0 incluye sondas para las regiones *gyrA*, *rrs* y *embB* detectando resistencias a fluoroquinolonas, aminoglicósidos y etambutol, respectivamente, y la tira MTBDRs/ V2.0 incluye sondas para las regiones *gyrA*, *gyrB*, *rrs* y *eis*. aumentando la sensibilidad para fluoroquinolonas y aminoglicósidos. Para la detección de resistencia a fluoroquinolonas la tira MTBDRs/ V.1.0 abarca la región del gen *gyrA* que codifica los aminoácidos 85 a 97 representadas por seis sondas. Para la detección de aminoglicósidos se estudia el gen *rrs*, estudiándose los intercambios nucleotídicos en la posición A1401G y G1484T y para la detección de resistencia de etambutol se estudia la región *embB* que corresponde a los intercambios nucleotídicos de ATG/ ATA (M306I) y ATG/ GTG (M306V), representando en la tira las mutaciones más comunes ^(102,180). El MTBDRs/ V.1.0 puede ser utilizado como una prueba inicial de resistencia a los fármacos de segunda línea, de tal forma que ante un resultado positivo se debe tener presente para empezar a tratar al paciente, aunque ante un resultado negativo se deberían aplicar otras pruebas convencionales para confirmación de esa sensibilidad ⁽¹⁸¹⁾.

De las cepas estudiadas para detección de mutaciones en estos genes obtuvimos unos resultados variables, sin poder agruparlos en ningún patrón mayoritario debido a que cada cepa mostró un patrón de bandas diferente. Los resultados obtenidos para el etambutol son mutaciones tanto en MUT1A (M306I) como MUT1B (M306V). Respecto a las fluoroquinolonas todas las cepas estudiadas y con

resistencia a FQ son del mismo paciente, con el mismo patrón detectando en el gen *gyrA* de mutación en MUT2 (S91P) mientras que la única cepa resistente a kanamicina detectada presentó un patrón en el gen *eis* de WT2 y mutación en MUT1 (C14T).

Revisando la bibliografía al respecto, en el estudio realizado por Tukvadze *et al.* se describe que la mutación de resistencia más común para cualquier resistencia a FQ es D94G (48%) seguido por A90V (29%). Los aislados resistentes a capreomicina y kanamicina tuvieron una mutación en la posición A1401G (100% y 84%, respectivamente) ⁽¹⁸²⁾. En otro estudio realizado por Lu *et al.* donde las mutaciones más comunes fueron en el gen *gyrA* ausencia de WT3 + presencia MUT3, en *rrs* presencia de banda MUT1, y en *embB* ausencia de WT + presencia de la banda MUT1B y/ o ausencia de WT + presencia de la banda MUT1A. Este autor describe que la sensibilidad del kit MTBDRs/ V.1.0 para la resistencia a fluoroquinolonas, aminoglucósidos y etambutol fue de 94.74%, 62.50% y 58.82%, respectivamente, mientras que la especificidad fue de 92.59%, 98.81% y 91.67%, respectivamente ⁽¹⁷⁸⁾.

De manera similar otro estudio realizado por Brossier *et al.*, describe que la mayoría de las mutaciones que dan resistencia a FQ se producen en *gyrA* (principalmente las mutaciones A90V y D94A más raramente, G88A y S91P) y en menor frecuencia en *gyrB*. La resistencia a los fármacos inyectables de segunda línea (capreomicina, amikacina y kanamicina) fue causada por mutaciones en las posiciones 1401, 1402 y 1484 en el gen *rrs* ⁽¹⁸³⁾.

La inclusión del gen *gyrB* que cubre regiones más grandes del *gyrA* y del gen *eis* para la detección de resistencia a kanamicina de bajo nivel mejoran la sensibilidad del ensayo para la detección de resistencias a fluoroquinolonas y aminoglucósidos/ péptidos cíclicos ⁽¹⁸⁴⁾. Por ello, el kit MTBDRs/ V.2.0 es superior a MTBDRs/ V.1.0 y detecta eficazmente las mutaciones más comunes involucradas en la resistencia a FQ y aminoglucósidos/ capreomicina. Sin embargo, debido a mutaciones no reconocidas por MTBDRs/ V.2.0 o la presencia de mecanismos de resistencia aún no caracterizados, los resultados de las cepas silvestres obtenidas con MTBDRs/ V.2.0 debe confirmarse mediante secuenciación del ADN y pruebas de susceptibilidad fenotípica a los fármacos. Además, la inclusión de otros genes, como *tylA*, para la detección de resistencia a capreomicina y/ o viomicina y otras regiones del gen *embB*, podría mejorar el rendimiento del ensayo ^(183,184).

Al igual que lo remarcado en diversos estudios, nuestros resultados van en la línea de concluir que los métodos moleculares comerciales son rápidos y fiables para la detección de resistencias permitiendo ajustar la terapia antituberculosa de forma precoz, aunque no detectan resistencias que se originan por mutaciones en otros genes menos frecuentes. Por ello, en la actualidad sigue siendo necesario confirmar la sensibilidad y/ o resistencia con métodos fenotípicos convencionales ^(185,186) o en su caso mediante secuenciación.

Diagnóstico de TB por RT- PCR desde muestra directa. Aplicaciones.

Ante un paciente con sospecha de TB, en determinadas situaciones como aquellas de entornos con baja prevalencia como Suiza ⁽¹⁸⁷⁾ se le mantiene aislado hasta la obtención de esputos y confirmación de su negatividad a partir inicialmente de la baciloscopia. Sin embargo, dada su baja sensibilidad se plantea la posibilidad de sustituirla por técnicas moleculares semicuantitativas para detección de presencia de *M. tuberculosis* complex, con metodología de PCR en tiempo real como es el GeneXpert MTB/ RIF (Chepeid[®]). Al ser éste un método aplicable de forma fácil a muestras directas y automatizado de PCR en tiempo real, que además detecta resistencia a rifampicina, son numerosos los trabajos que intentan establecer la idoneidad de sus indicaciones ⁽¹⁸⁸⁾.

El tratamiento de la tuberculosis tiene un coste elevado asociado no sólo al tratamiento sino básicamente por hospitalización pautada ante paciente con sospecha clínica, pero con baciloscopia inicialmente negativa. Si la confirmación diagnóstica no llega hasta el resultado del cultivo o hasta descartar otras posibles causas del cuadro clínico del paciente, ello conllevará el uso de otras técnicas diagnósticas de imagen con incremento de costes. Estudios de coste- efectividad sobre el GeneXpert realizados en países en vías de desarrollo con elevada carga de TB muestran que GeneXpert es coste- efectivo y su introducción podría suponer un cambio importante en la morbi- mortalidad de la infección mediante la mayor detección de casos y, por tanto, de tratamientos dirigidos ⁽¹⁸⁹⁾.

En nuestro trabajo se decidió incluir entre las múltiples técnicas de amplificación, tanto “in house” como aquellas disponibles comercialmente ^(54,55,190) esta técnica de PCR en tiempo real, el GeneXpert MTB/ RIF- Chepeid[®], que es ampliamente

utilizada ^(191,192) por los laboratorios de micobacterias, lo que facilita su evaluación a la hora de comparar y valorar los resultados obtenidos y su papel en la disminución de la demora diagnóstica en nuestro propio medio.

Dado que la prueba GeneXpert MTB/ RIF es una de las técnicas indicadas en los casos de sospecha, numerosos trabajos intentan estudiar no solo la adecuación de las indicaciones de forma similar a este estudio, sino objetivar los resultados en base al cálculo de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de esta prueba utilizando como *gold standard* el cultivo de las micobacterias. La sensibilidad de la técnica GeneXpert, varía según algunos estudios, se sitúa entre el 81% ⁽¹⁸⁸⁾ y 92% ⁽¹⁸⁷⁾ mientras que la especificidad de esta técnica según los estudios se encuentra entre el 93,4% ⁽¹⁸⁸⁾ y el 99,4% ⁽¹⁸⁷⁾. Aporta el beneficio de no tratar a pacientes infectados o portadores de MNT en aquellos pacientes bacilíferos sin TB evitando toxicidad por los medicamentos innecesaria.

La implantación en la rutina diagnóstica en el Servicio de Microbiología del HUDr. Peset del sistema de PCR en tiempo real (GeneXpert MTB/ RIF) a partir del año 2010 contribuyó de forma especial en nuestro caso a la detección precoz, en menos de 3 horas que es el tiempo que consume la técnica, no solo del caso de TB sino de la posible resistencia a rifampicina desde muestra clínica directa. Así, se pudieron detectar los casos de resistencia a rifampicina aislados en este periodo, tanto en baciloscopia positiva como negativa, disminuyendo la demora en su detección.

Nuestros resultados de sensibilidad del GeneXpert (96,03%), especificidad (97,67%) y de los valores predictivos positivos y negativos (97,97% y 95,45% respectivamente) son similares a los descritos en diversos trabajos. Algunos ejemplos se resumen a continuación: Held *et al.* en el que obtienen una sensibilidad del GeneXpert del 95,6% y una especificidad del 96,2%, con un valor predictivo positivo del 97,7% y valor predictivo negativo del 92,6% ⁽⁷⁷⁾. En el trabajo de Huh *et al.* los datos generales de sensibilidad, especificidad VPP y VPN fueron de 91,3%, 94,0%, 90,5% y 94,6% respectivamente ⁽⁸⁰⁾. Bajrami *et al.* publican unos valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de 82,3%, 97,6%, 93,3% y del 93,0% respectivamente ⁽¹⁹³⁾, mientras que Viñuelas *et al.* describen una sensibilidad del 95% y especificidad del 98% ⁽¹⁹⁴⁾.

Al igual que en nuestro trabajo, distintos autores resaltan la elevada sensibilidad y especificidad de este método para MTB, aunque asociadas en cada caso al tipo de TB y a positividad de la baciloscopia. Así los valores predictivos dependen de la positividad de la baciloscopia, con elevada sensibilidad en caso de positividad de la misma o incluso en los casos BAAR negativos con elevado grado de sospecha clínica de TB ⁽¹⁹⁵⁾. Su efectividad en muestras clínicas con baciloscopia negativa ha sido demostrada cuando la técnica se aplica sobre pacientes seleccionados.

En nuestro trabajo la PCR a tiempo real se realizó sobre muestras de casos con elevada sospecha, expresada específicamente por el clínico y solicitada directamente al laboratorio a pesar incluso de ser baciloscopia negativa. De forma similar informa Nebreda *et al.* en un estudio reciente de 2013, realizado sobre 48 muestras respiratorias BAAR negativas, obtienen un VPP del 100% tanto sobre muestras respiratorias como no respiratorias, lo que les permite diagnosticar un 23% más de TB en tiempo inferior a 3 horas, siempre seleccionando los casos en base a la sospecha fundamentada de TB ⁽¹⁹⁶⁾.

Dado el problema general de diagnóstico en TB en casos extrapulmonares hay autores que recomiendan esta metodología como adecuada para inclusión en rutina diagnóstica, tras evaluar los excelentes resultados obtenidos cuando se aplican de forma adecuada ^(197,198).

El rendimiento general del GeneXpert es variable pues según su aplicación clínica y el tipo de muestra. En nuestro caso, sobre TBP/ TBEP se observan diferencias, si bien los resultados mejoran con los de la baciloscopia inicial. Un estudio realizado por Kim *et al.* describe para las muestras respiratorias en general una especificidad del 98% ⁽⁹⁸⁾. Según la baciloscopia positiva o negativa los resultados varían siendo la sensibilidad en BAAR positiva de 96,2% pero del 76,0% en muestras con BAAR negativos ⁽⁸⁰⁾. Estos datos son similares a los publicados recientemente en 2017, por Saeed *et al.* obteniendo unos resultados del GeneXpert de sensibilidad del (97,5%) y especificidad del (98,8%) y una sensibilidad del 100% en baciloscopias positivas y un 42% en baciloscopias negativas. También describe buenos resultados para la detección de resistencia a rifampicina ⁽¹⁹⁹⁾. Algo similar se describe en un estudio realizado en Madrid, donde objetivan mejores resultados sobre muestras respiratorias. El porcentaje de coincidencia para detección de la resistencia a rifampicina fue del

100% ⁽²⁰⁰⁾. En la bibliografía al respecto encontramos otros trabajos que describen resultados similares ^(188,201,202,203).

Los criterios que se utilizaron en este trabajo para petición de PCR en tiempo real de MTB para el diagnóstico directo a partir de muestras clínicas son muy similares a los que describe Samper *et al.* ⁽¹⁵⁷⁾ en su trabajo siendo: i) sospecha moderada y elevada de TB; ii) sospecha de formas diseminadas y extrapulmonares; iii) sospecha de TB en VIH y/ o población pediátrica; y iv) confirmación de especie MTB en baciloscopia positiva.

El potencial de la técnica GeneXpert para la disminución de los costes diagnósticos y abordaje terapéutico precoz en paciente con sospecha de tuberculosis no parece discutible desde esta perspectiva. Sin embargo, en nuestro estudio hemos evaluado los motivos de las peticiones clínicas de GeneXpert, viendo que en numerosas ocasiones la clínica del paciente no era sugerente de tuberculosis, lo que habría evitado gastos por petición inadecuada. Por ello, habría que concienciar en mayor grado a los peticionarios para que se soliciten este tipo de pruebas en base a las indicaciones adecuadas y no como método de rutina ante casos sin sospecha clínica fundada.

Una de las aplicaciones de esta metodología, que pudimos confirmar en este trabajo, es la interpretación de baciloscopias positivas cuando la PCR no amplifica. En 6 pacientes BAAR positivos, a los que se les realizó de forma rutinaria GeneXpert MTB/RIF al tratarse de casos nuevos, la PCR en tiempo real de TB a partir de la muestra fue negativa, creciendo tras incubación de los medios 6 MNT. Estos pacientes fueron diagnosticados de micobacteriosis pulmonar no tuberculosa. Así, la negatividad de la prueba puso en antecedentes al clínico en menos de 3 horas de la posible presencia de cepa MNT a pesar de la positividad inicialmente informada de la baciloscopia.

Se debe considerar, tal como se describe en otros estudios ya comentados y en nuestro estudio, que la prueba de GeneXpert MTB/RIF, a pesar de su elevada sensibilidad y especificidad y a los elevados valores de VPP y VPN, no debería ser la única herramienta diagnóstica de una tuberculosis, ya que estas cifras van asociadas a la incidencia en cada área. Posee además la ventaja al comparar con baciloscopia (además de su mejor sensibilidad y su mejor VPN) de que al ser una técnica

semicuantitativa existe una correlación entre resultado de BAAR y resultado de positividad en grados (de muy bajo a elevado) de concentración de ADN en la muestra.

A pesar de ello en la actualidad se sigue aplicando la PCR en tiempo real sobre muestra en aquellos casos justificados, siendo el cultivo en medio sólido y/ o líquido en estos momentos, al menos en nuestro entorno, la prueba definitiva para un correcto diagnóstico etiológico completo de la tuberculosis.

Aplicaciones de la Secuenciación genómica en *Mycobacterium tuberculosis*.

La secuenciación masiva abre un nuevo campo en el estudio de la tuberculosis y permite conocer mejor las características del microorganismo en relación con la interacción con diferentes fármacos y en relación con su virulencia y patogenicidad. Esta técnica confirma en la gran mayoría de los casos los datos que se obtienen con las técnicas clásicas de estudio de la sensibilidad antibiótica. En relación con la comparación de genomas con las características clínicas de la enfermedad, aunque nosotros no hemos encontrado diferencias, debe profundizarse en el estudio de este parámetro, incluyendo análisis del transcriptoma y el metaboloma de dicho microorganismo con objeto de detectar parámetros que se asocian a las diferentes situaciones clínicas que se observan en este proceso ⁽²⁰⁴⁾. Por tanto, el genoma completo como marcador diagnóstico permite la identificación de resistencias a antibióticos que no forman parte de los paneles habituales de pruebas diagnóstico permitiendo confirmar y/ o mejorar el diagnóstico microbiológico. Por otra parte, como marcador epidemiológico presenta una gran robustez, reproducibilidad y resolución ⁽²⁰⁵⁾. De manera que la secuenciación del genoma entero, la genómica comparativa y la biología de sistemas están generando nuevas perspectivas sobre los orígenes y la evolución continua de *M. tuberculosis*, así como de su patogenicidad teniendo implicaciones importantes sobre la perspectiva de la enfermedad, el desarrollo de nuevos fármacos y vacunas y el tratamiento aplicado al paciente ⁽²⁰⁶⁾.

Mycobacterium tuberculosis tiene problemas únicos para la secuenciación de su genoma y análisis basados en su fisiología y la composición de sus genomas compuestos por un alto contenido en guanina y citosina. La calidad de los datos depende en gran medida de la pureza de las muestras de ADN secuenciadas y su contenido, por tanto, el rendimiento de la secuenciación es variable. De momento los

métodos convencionales utilizados en rutina todavía son necesarios para asegurar los resultados de resistencias a nivel clínico ⁽²⁰⁷⁾.

La secuenciación del genoma nos da varias ventajas frente a la rutina diaria utilizada en un laboratorio de microbiología: i) identifica el origen filogenético de cada cepa indicando a que linaje y sublinaje pertenece; ii) permite detectar la coexistencia de poblaciones y microevolución intrapaciente; iii) sirve como buen marcador epidemiológico, lo que permite un mayor conocimiento de la cepa y ayuda a obtener mejores resultados de diagnóstico y tratamiento; iv) estudia los casos de transmisión entre pacientes y la identificación de casos índices en grupos de transmisión complejos; y v) permite detectar todo tipo de resistencias, tanto las más frecuentes como las más inusuales no detectables por las técnicas convencionales. A pesar de todas estas ventajas la secuenciación tiene un gran inconveniente, la lentitud para dar un resultado, ya que, por el momento, para poder secuenciar la cepa es necesario que esté crecida en medio de cultivo y eso enlentece la confirmación de diagnóstico clínico y la detección de resistencias.

Con todas estas posibles utilidades en nuestro estudio se incluyeron para secuenciación las cepas MDR-TB. De ellas el 90% fueron de linaje 4 y solo una de linaje 2. De las cepas de linaje 4 los sublinajes mayoritarios fueron LAM, Harlem y PGG3. Estos resultados coinciden con la mayoría de los estudios realizados en otros hospitales en nuestro entorno, aunque los estudios publicados sobre linajes en España son escasos.

Nuestros resultados son similares a lo publicado con cepas de Castellón, donde los genotipos circulantes más frecuentes pertenecieron a los linajes Haarlem (35,38%), PGG-3 (33,84%) y LAM (18,46%) ⁽¹³²⁾.

En otro estudio de nuestro entorno, realizado en el Hospital La Fe (2010- 2013) se determinó el linaje de 35 cepas, siendo todas de linaje 4 excepto 5 (1 de linaje 1, 3 del linaje 3 y 1 de linaje 5) ⁽²⁰⁸⁾. En un estudio realizado en Guipúzcoa sobre 6 cepas multirresistentes, cuatro de ellas, aisladas en personas extranjeras, pertenecieron a genotipos no europeos (2 Beijing y 2 Delhi). Las otras dos (una de origen autóctono y otro extranjero) pertenecieron a genotipos del linaje Euroamericano (LAM y Uganda)⁽¹⁶⁷⁾.

Tenemos dos cepas descritas como caso de transmisión, ya que entre una y otra solo tienen dos SNPs de diferencia. Esto se está estudiando en la actualidad en nuestra Comunidad. En 2015 se publicó un estudio de secuenciación masiva sobre el 70% de las cepas de MTB aisladas en la Comunitat Valenciana entre 2014- 2015, analizando la transmisión entre pacientes y la identificación de casos índices. La mayor parte de los casos de transmisión directa presentaron diez cambios nucleotídicos o menos cuando se comparan entre sí ⁽²⁰⁵⁾. Así pues, con la secuenciación del genoma entero se puede detectar más fácilmente los brotes de tuberculosis y permite además conocer la dirección de transmisión entre casos ⁽²⁰⁹⁾.

Al comparar los resultados de los genes de resistencia a tuberculostáticos y sus mutaciones tras secuenciación observamos que, aunque en general son los mismos que los obtenidos por los métodos moleculares convencionales utilizados en la rutina del laboratorio para detección de las mutaciones más comunes, con la secuenciación también se pudo detectar nuevas mutaciones que no se incluyen en los sistemas comercializados, ya que no están descritas como las más frecuentes. Es el caso de las cepas multirresistentes de un paciente con tuberculosis durante 11 años, donde gracias a la secuenciación se pudo detectar la mutación a la isoniacida que no se detectaba con los kits moleculares comerciales aplicados habitualmente en rutina. Esta mutación poco frecuente a la isoniacida (*KatG*: 2155828- Y95C) se confirma en el estudio de Torres *et al.* siendo estos pacientes los principales candidatos para la conversión a MDR- TB ⁽²¹⁰⁾.

En nuestro estudio, a excepción de este gen de isoniacida poco frecuente, se han detectado las mutaciones asociadas a resistencia más comunes, tal como también describe Viñuelas *et al.* ⁽¹⁹⁴⁾ como son la mutación en *katG* e *inhA* para isoniacida, en *rpoB* para rifampicina, para estreptomycin *rpsL* o *rrs*, para etambutol *embB* y para pirazinamida el *pncA* en fármacos de primera línea y para antituberculostáticos de segunda línea las mutaciones más frecuentes son *gyrA* y *gyrB* para las fluoroquinolonas y para kanamicina la mutación en el gen *eis*.

Así, la aplicación de técnicas de secuenciación en las cepas MDR-TB en nuestro estudio nos llevó a la conclusión de que esta metodología resulta válida para estudios de linajes, detección de coexistencia de poblaciones, microevolución intrapaciente, estudio de casos de transmisión entre pacientes y la detección de

mutaciones asociadas a resistencias poco frecuentes, aunque por el momento continua siendo imprescindible el uso de las técnicas convencionales de identificación y detección de resistencias utilizadas en el laboratorio de micobacterias.

5.3.- Soluciones microbiológicas a la demora diagnóstica de la TB.

Ante la lentitud del diagnóstico convencional de la TB, uno de los objetivos básicos para el correcto manejo de un paciente con TB es su diagnóstico precoz. Para ello, se dispone de nuevos métodos rápidos y eficaces en el diagnóstico no solo de especie MTB sino también de detección de cepas resistentes a tuberculostáticos de primera línea, como es el caso de la rifampicina e isoniazida para casos MDR-TB, tal como se ha comentado a lo largo del trabajo.

Cuando se habla de demora en TB se manejan básicamente tres conceptos: i) demora microbiológica de caso TB; ii) demora en la declaración del caso como EDO; y iii) demora diagnóstica según los informes de la Conselleria de Sanitat, si se trata de los casos estudiados en nuestro medio. Uno de los objetivos del trabajo fue estudiar la disminución de demora microbiológica utilizando técnicas rápidas de diagnóstico, valorando la repercusión que ello puede tener en las demoras de TB informadas desde los organismos oficiales. La demora “microbiológica” se define como aquella que se produce desde que se recibe la muestra del paciente en el Servicio de Microbiología hasta que el diagnóstico de especie MTB.

La demora en nuestro medio fue mayor en los inicios del trabajo (años 2005-2009), ya que se utilizaba para identificación el sistema Accuprobe TBC (BioMérieux®) ligado a la necesidad de disponer de masa bacteriana crecida en medio de cultivo. Tras cambiar en 2010 a la utilización de IC para detección de TB (BD®) directa desde MGIT y/ o aplicación de PCR en tiempo real directa desde muestra (GeneXpert MTB/ RIF, Chepeid®), la demora disminuyó de forma significativa de una media de 15,4 días en 2005 a 3,1 días en 2015. Esto fue así al realizar PCR en tiempo real con detección incluida de resistencia a rifampicina sobre muestra directa de todos los casos nuevos con baciloscopia positiva y sobre aquellas baciloscopias negativas con sospecha clínica elevada de TB y petición expresa a microbiología de PCR en tiempo real.

En datos de demora acumulados se observa como en nuestro estudio prácticamente el 75% de los casos se diagnosticaron en los 4 primeros días, a partir del procesamiento de la muestra del paciente. Además, en más del 40% la identificación se obtuvo en las primeras 24 horas, al utilizarse PCR en tiempo real. Menos del 10% de los casos necesitaron más de 2 semanas, para llegar a un diagnóstico, correspondiendo éstos a los casos BAAR negativos sin petición de PCR al no estar justificada por no existir o no informar al microbiólogo de una sospecha clínica. Entre los casos diagnosticados en las primeras 24 horas se incluyeron los pacientes con resistencia a rifampicina asociada a isoniacida (cepas MDR-TB).

Si se analizan los datos obtenidos tras revisión de los Informes de la Conselleria sobre TB en nuestro medio para ver el impacto que la mejora en el diagnóstico microbiológico comentado ha tenido en la demora diagnóstica que figura en los datos oficiales, aunque el tipo de demora y cálculos que se aplican utilizan criterios distintos, se detectan discrepancias importantes que habría que valorar para poder pautar de una manera más coordinada la labor entre epidemiología, clínica y microbiología.

En concreto si se habla de demora diagnóstica a partir de los Informes de Salud de la Conselleria sobre TB vemos que en el Hospital Universitario Dr. Peset la demora final desde inicio de síntomas según encuesta y detección de caso es de 26 días en 2005 y 46,4 días en 2013, no estando publicadas los dos últimos años. En los datos del Hospital La Fe, en el Hospital Clínico Universitario de Valencia y en el Consorcio Hospital General Valencia también se incrementa la demora en los últimos años, al igual que ocurre en la media en la Comunitat Valenciana, pasando de una media de 33 días en los primeros años a una media de 56 días en los últimos años (2012 y 2013)^(17,27-31,127).

Parece poco lógico de entrada que cuando, desde el Servicio de Microbiología del Peset la demora microbiológica se disminuye en más de 10- 15 días en los últimos 3 años, pasando a 24 horas en casi el 60% de los casos, las cifras oficiales de demora diagnóstico desde Conselleria informen de demoras de 65,8 días precisamente en el año 2012, donde la media de confirmación microbiológica de caso TB no superó los 4 días. La implantación en nuestro ámbito de Salud Pública desde la Conselleria de Sanitat de la RedMiva, desde la que se captan en tiempo real desde Salud Publica los resultados microbiológicos, deberían ayudar a aproximar más la realidad

epidemiológica a la microbiología hospitalaria del día a día, siempre teniendo presente que las variables que calculan la demora no son realmente comparables, al manejar factores distintos.

6.-Conclusiones

1.- Los casos de tuberculosis confirmada, así como las tasas de incidencia, disminuyen progresivamente en el Departamento de Salud Valencia Doctor Peset durante el periodo 2005 a 2015, en especial desde el año 2012 con tasa de 7,6/ 10⁵ habitantes, asociado a un incremento constante de aislamientos de MNT y siguiendo la tendencia descrita en la Comunitat Valenciana.

2.- La TB en este Departamento presenta como patrón mayoritario: paciente varón, diagnosticado desde Urgencias, entre 25- 55 años y/ o mayor de 75 años, VIH negativo, afectación pulmonar y nacionalidad española. Solo un tercio de casos TB se asocian a inmigración, procedente en su mayoría de América del sur, seguido de África y Europa del Este, no demostrándose diferencias entre este grupo respecto al global. La coinfección TB- VIH solo se demuestra en el 10% de casos. En más del 25% del global no se realiza determinación de Ac anti- VIH. Esta práctica sigue sin implantarse en nuestro medio.

3.- La rentabilidad global de la baciloscopia está cercana al 50%, con diferencias significativas en casos de TB extrapulmonar o coinfección TB- VIH, donde no superan el 20%- 40% respectivamente.

4.- La introducción progresiva a lo largo del periodo en la rutina diagnóstica de micobacterias de métodos de cultivo automatizado en medio líquido, inmunocromatografía para detección de Ag MPT64, PCR- hibridación para identificación de especie y PCR en tiempo real directa de muestra, ha producido un descenso progresivo de demora diagnóstica microbiológica de los casos de TB en nuestro medio, llegando hasta una media de 3 días en el último año del estudio. No se objetiva impacto de este hecho sobre la demora diagnóstica global de la TB en nuestro departamento según datos de Consellería.

5.- La introducción de PCR en tiempo real (GeneXpert MTB/ RIF) en 2010 ha contribuido de forma especial a la detección precoz de casos de TB y/ o resistencia a rifampicina, asociada a isoniacida, con sensibilidad, especificidad y valores predictivos elevados, aunque variables según las características de población estudiada. En general la justificación de la petición clínica es adecuada en los casos con TB confirmada, pero no ocurre lo mismo en los casos sin TB, donde cerca del 50% de las peticiones no presentaban sospecha clínica objetivada en la HC.

6.- El estudio de sensibilidad de MTB a tuberculostáticos de primera línea por métodos fenotípicos nos muestra unos porcentajes de resistencia en general bajos, solo por encima del 5% en el caso de la rifampicina y estreptomycin, con cifras de MDR-TB inferior al 2%. No se detectan diferencias significativas por años, edad, tipo de TB, nacionalidad, ni asociación a coinfección TB-VIH. Mediante PCR- hibridación se confirma que los patrones de mutaciones mayoritarios asociados con resistencia a isoniacida, rifampicina y etambutol son las habituales descritos en nuestro entorno. Sólo se describen dos casos de cepas pre- XDR-TB.

7.- Las técnicas de secuenciación sobre MDR-TB, si bien presentan el problema de complejidad metodológica, se muestran válidas en nuestro medio para: estudio de linajes (mayoritariamente Linaje 4), detección de coexistencia de poblaciones, microevolución intrapaciente y estudios de transmisión. El estudio de resistencias tras secuenciación coincide en general con los datos obtenidos por métodos convencionales, describiéndose además mutaciones no detectadas por PCR- hibridación. Sin embargo, los resultados obtenidos no modifican las pautas del tratamiento de estos pacientes.

7.-Bibliografía

-
- 1- WHO Global Tuberculosis Report. 2016. World Health Organization. Geneva, Switzerland. ISBN 9789241565394. WHO/HTM/TB2016.13.
 - 2.- Alcaide F, Esteban J, González-Martín J, Palacios JJ. Editores: Cercenado E, Cantón R. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [9a]. SEIMC; 2005. Available at: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap9a.pdf>
 - 3.- De Assunção TM, Batista EL, Deves C, Villela AD, Pagnussatti VE, *et al.* Real time PCR quantification of viable *Mycobacterium tuberculosis* from sputum samples treated with propidium monoazide. Elsevier Tuberculosis. 2014;94:421-427.
 - 4.- Salas J, Rogado MC, Lozano AB, Cabezas MT. Tuberculosis e inmigración. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2016;34(4):261- 269.
 - 5.- Paulson T. Epidemiology: A mortal foe. Nature. 2013;502(7470):S2–S3
 - 6.- González J, García JM, Anibarro L, Vidal R, Esteban J, Blanquer R, *et al.* Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;28(5):297.e1-297.e2.
 - 7.- Heemskerk D, Caws M, Marais B, Farrar J. Tuberculosis in Adults and Children. SpringerBriefs in Public Health. 2015. ISBN:9783319191324.
 - 8.- Centers for Diseases Control and Prevention. Extensively Drug-Resistant TB. US 1993–2006. MMWR. 2007;56:250–3.
 - 9.- Feng Y, Liu S, Wang Q, Wang L, Tang S, Wang J, *et al.* Rapid diagnosis of Drug Resistance to Fluoroquinolones, Amikacin, Capreomycin, Kanamycin and Ethambutol Using Genotype MTBDRs/ Assay: A Meta- Analysis. PLoS ONE. 2013;8(2):e55292.
 - 10.- Tyrrell FC, Budnick GE, Elliott T, Gillim-Ross L, Hildred MV, Mahlmeister P, *et al.* Probability of Negative *Mycobacterium tuberculosis* Complex Cultures Based on Time to Detection of Positive Cultures: a Multicenter Evaluation of Commercial-Broth-Based Culture Systems. Journal of Clinical Microbiology. 2012;50(10):3275-3282.
 - 11.- Moure R, Muñoz L, Torres M, Santín M, Martín R, Alcaide F. Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Rifampin Resistance in Smear-Negative Clinical Samples by Use of an Integrated Real-Time PCR Method. Journal of Clinical Microbiology. 2011;49(3):1137-1139.
 - 12.- Brent AJ, Mugo D, Musyimi R, Mutiso A, Morpeth S, Levin M, *et al.* Performance of the MGIT TBc Identification Test and Meta-Analysis of MPT64 Assays for Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Liquid Culture. Journal of Clinical Microbiology. 2011;49(12):4343-4346.
 - 13.- Schutz C, Meintjes G, Almajid F, Wilkinson RJ, Pozniak A. Clinical management of tuberculosis and HIV-1 co-infection. Eur Respir. 2010;36:1460-1481.
 - 14.- Orcau A, Caylà JA, Martínez JA. Present epidemiology of tuberculosis. Prevention and control programs. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29(Supl 1):2-7.
 - 15.- Helb D, Jones M, Story E, Boehme C, Wallace E, Ho k, *et al.* Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Rifampin Resistance by Use of On-Demand, Near-Patient Technology. Journal of Clinical Microbiology. 2010;48(1):229-237.

- 16.- Caminero JA, Caylà JA, García JM, García FJ, Palacios JJ, Ruiz J. Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis con resistencia a fármacos. Arch Bronconeumol. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arbres.2017.02.006>.
- 17.- Informe Tuberculosis Comunitat Valenciana 2015. Vigilancia Epidemiológica Año 2015. Responsable Edición: Servicio de Vigilancia y Control Epidemiológico. Dirección General de Salud Pública. <http://www.sp.san.gva.es/epidemiologia>.
- 18.- Said HM, Ismail N, Osman A, Velsman C, Hoosen AA. Evaluation of TBc Identification Immunochromatographic Assay for Rapid Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Samples from Broth Cultures. Journal of Clinical Microbiology. 2011;49(5):1939-1942.
- 19.- Rodríguez E, Villarubia S, Diaz O, Hernandez G, Tello O. Situación de la tuberculosis en España. Casos de tuberculosis declarados en la RED Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Boletín epidemiológico Semanal 2015;23(3):25-41.
- 20.- Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Informe epidemiológico sobre la situación de la tuberculosis en España. Año 2014. Madrid, 2015.
- 21.- European Centre for Disease Prevention and Control/ WHO. Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2017.
- 22.- Casals M, Rodrigo T, Camprubí E, Orcau A, Caylà J. Tuberculosis e inmigración en España. Revisión Bibliográfica. Rev Esp Salud Pública. 2014;88:803-809.
- 23.- Navascués A, Otamendi I, Torroba L, Álvaro AI, Ojer M, Ruz A, et al. *M. tuberculosis* Complex drug resistance in Navarre: differences between the local and immigrant populations. An Sist Sanit Navar. 2009;32(2):243-248.
- 24.- Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Informe epidemiológico sobre la situación de la tuberculosis en España. Año 2013. Madrid, 2014.
- 25.- Jiménez MS, Casal M. Grupo Español de Micobacteriología (GEM) Situación de las resistencias a fármacos de *Mycobacterium tuberculosis* en España. Rev Esp Quimioter. 2008;21:22-5.
- 26.- Centro Nacional de epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Informe epidemiológico sobre la situación de la tuberculosis en España. Año 2012. Madrid, 2013.
- 27.- Informes de salud: Informe de tuberculosis en la Comunitat Valencina año 2010. Nº 130. Edita: Generalitat València, Conselleria de Sanitat. 1ª edición. <http://www.sp.san.gva.es/epidemiologia>
- 28.- Informes de salud: Informe de tuberculosis en la Comunitat Valencina año 2011. Nº 134. Edita: Generalitat València, Conselleria de Sanitat. 1ª edición. <http://www.sp.san.gva.es/epidemiologia>
- 29.- Informes de salud: Informe de tuberculosis en la Comunitat Valencina año 2012. Nº 143. Edita: Generalitat Valenciana, Conselleria de Sanitat. 1ª edición. <http://www.sp.san.gva.es/epidemiologia>
- 30.- Informe Tuberculosis Comunitat Valenciana 2013 Vigilancia Epidemiológica. Responsable Edición: Servicio de Vigilancia y Control Epidemiológico. Dirección General de Salud Pública. <http://www.sp.san.gva.es/epidemiologia>

-
- 31.- Informe Tuberculosis Comunitat Valenciana 2014. Vigilancia Epidemiológica. Responsable de la Edición: Servicio de Vigilancia y Control Epidemiológico. Dirección General de Salud Pública. <http://www.sp.san.gva.es/epidemiologia>.
- 32.- Cunha J. Pyrazinamide susceptibility testing in all isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex – a critical analysis. Rev Port Pneumol. 2012;18(4):188-189.
- 33.- Grupo de trabajo del área TIR de SEPAR Recomendaciones SEPAR. Normativa sobre la prevención de la tuberculosis. Arch Bronconeumol. 2002;38: 441–51.
- 34.- Guía para la vigilancia y control de la Tuberculosis. Número 51 de Serie M. Editor: Generalitat Valenciana, Conselleria de Sanitat, 2007. ISBN: 9789448248468.
- 35.- Kirschner DE, Young D, Flynn JL. Tuberculosis: Global Approaches to a Global Disease. Curr Opin Biotechnol. 2010;21(4):524-531.
- 36.- Ruiz-Manzano J, Blanquer R, Calpe J, Caminero JA, Caylà J, Domínguez JA, *et al*. Normativa SEPAR sobre diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis. Arch Bronconeumol. 2008;44:551–6.
- 37.- American Thoracic Society, Centers for Disease Control and Prevention and Infectious Diseases Society of America. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. Am J Respir Crit Care Med. 2000;161:S221–47.
- 38.- López R, Badillo C, Cerna JF, Castillo I, Rivera S, Helguera A, *et al*. First insights into the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from HIV-infected Mexican patients and mutations causing multidrug resistance. BMC Microbiology. 2010;10:82.
- 39.- Mayosi BM, Burgess LJ, Doubell AF. Tuberculous pericarditis. Circulation. 2005;112:3608–16.
- 40.- Purohit M, Mustafa T. Laboratory Diagnosis of Extra-pulmonary Tuberculosis (EPTB) in Resource- constrained Setting: State of the Art, Challenges and the Need. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2015;9(4):EE01-EE06.
- 41.- Lee YE. Diagnosis and Treatment of Extrapulmonary Tuberculosis. Tuberc Respir Dis. 2015;78:47-55.
- 42.- Centers for Diseases Control and Prevention. Guidelines for the investigation of contacts of persons with infectious tuberculosis; recommendations from the national Tuberculosis Controllers Association and CDC, and Guidelines for using QuantiFERONs-TB Gold test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection. United States. MMWR. 2005;54:1–55.
- 43.- Cagatay AA, Caliskan Y, Aksoz S, Gulec L, Kucukoglu S, Cagatay Y, *et al*. Extrapulmonary tuberculosis in immunocompetent adults. Scand J Infect Dis. 2004;36:799–806.
- 44.- Daley C. The typically “atypical” radiographic presentation of tuberculosis in advanced HIV disease. Tuberc Lung Dis. 1995;76:475–6.
- 45.- Yang Z, Kong Y, Wilson F, Foxman B, Fowler AH, Marrs CF, *et al*. Identification of risk factors for extrapulmonary tuberculosis. Clin Infect Dis. 2004;38:199–205.
- 46.- National Collaborating Centre for Chronic Conditions. Tuberculosis: clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control. London: Royal College of Physicians; 2006. Disponible en: <http://www.nice.org.uk/nicemedia/pdf/CG033FullGuideline.pdf>
-

47.- Runyon EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. The Medical clinics of North America. 1959; 43 (1): 273–290.

48.- Aranaz A, Liebana E, Gomez E, Galan JC, Cousins D, Ortega A, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp.nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. International Journal of Systematic Bacteriology. 1999;49:1263-1273.

49.- Cousins D, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, *et al.* Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. Nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2003;53:1305-1314.

50.- Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, Van Helden PD, Warren RM, *et al.* Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. Emerg Infect Dis. 2010;16(8):1296-9.

51.- Van Ingen J, Rahim Z, Mulder A, Boeree MJ, Simeone R, Brosch R, *et al.* Characterizations of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* Complex subspecies. Emerg. Infect. Dis. 2012;18(4):653-5.

52.- Maurya AK, Nag VL, Kant S, Kushwaha RA, Kumar M, Mishra V, *et al.* Evaluation of an immunochromatographic test for discrimination between *Mycobacterium tuberculosis* Complex & non tuberculous mycobacteria in clinical isolates from extra-pulmonary tuberculosis. Indian J Med Res. 2012;135:901-906.

53.- Camarena JJ, González R. Micobacterias atípicas y su implicación en patología infecciosa pulmonar. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29(Supl5):66-75.

54.- LJ Jiang J, WJ Wu, H Wu, Ryang SS, Zhou J, Wu W, *et al.* Rapid Detection and Monitoring Therapeutic Efficacy of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Using a Novel Real-Time Assay. Journal of Microbiology and Biotechnology. 2012;22(9):1301-1306.

55.- Tortoli E, Urbano P, Marcelli F, Simonetti T, Cirillo D. Is Real-Time better than Conventional PCR for *Mycobacterium tuberculosis* Complex Detection in Clinical Samples?. Journal of Clinical Microbiology. 2012;50(8):2810-2813.

56.- Alcaide F, Coll P. Advances in rapid diagnosis of tuberculosis disease and anti-tuberculous drug resistance. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29(Supl 1):34-40.

57.- Moure R, Torres M, Martín R, Alcaide F. Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Clinical Samples by a Molecular Method Based on GenoQuick Technology. Journal of Clinical Microbiology. 2012;50(6):2089-2091.

58.- Tohir Al-Habib, Rasolofo V, Andrianarisoa SH, Ranjalaly GM, Ramarokoto H. Validation of an immunochromatographic assay kit for the identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106(6):777-780.

59.- Yu MC, Chen HY, Wu MH, Huang WL, Kuo YM, Yu FL, *et al.* Evaluation of the Rapid MGIT TBc Identification Test for Culture Confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strain Detection. Journal of Clinical Microbiology. 2011;49(3):802-807.

60.- Wu N, Zhang Y, Fu J, Zhang R, Feng L, Hu Y, *et al.* Performance Assessment of a Novel Two-Step Multiple Displacement Amplification-PCR Assay for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Sputum Specimens. Journal of Clinical Microbiology. 2012;50(4):1443.

-
- 61.- Pfyffer GE, Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, *et al.* Mycobacterium: general characteristics, laboratory detection and staining procedures. In: Manual of clinical microbiology. 9th ed., Washington DC: ASM Press; p. 543–2.
- 62.- Van Deun A, Hamid Salim A, Aung KJ, Hossain MA, Chambugonj N, Hye MA, *et al.* Performance of variations of carbolfuchsin staining of sputum smears for AFB under field conditions. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2005;9:1127–33.
- 63.- Lu PL, Yang YC, Huang SC, Jenh YS, Lin YC, Huang HH, *et al.* Evaluation of the Bactec MGIT 960 System in Combination with the MGIT TBc Identification Test for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Respiratory Specimens. *Journal of Clinical Microbiology.* 2011;49(6):2290.
- 64.- Worodria W, Anderson J, Cattamanchi A, Davis JL, den Boon S, *et al.* The Role of Speciation in Positive Lowenstein-Jensen Culture Isolates from a High Tuberculosis Burden Country. *PLoS ONE.* 2011;6(11):e27017. doi:10.1371/journal.pone.0027017.
- 65.- García P, García L, Rodríguez MJ, Rodríguez M. Identificación rápida en cultivos líquidos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante un método inmunocromatográfico. *Rev Esp Quimioter.* 2010;23(4):206-209.
- 66.- Ahmad S, Mokaddas E, Al-Mutairi N, Eldeen HS, Mohammadi S. Discordance across Phenotypic and Molecular Methods for Drug Susceptibility Testing of Drug- Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in a Low Incidence Country. *PLoS ONE.* 2016;11(4):e0153563.
- 67.- Rodriguez C, Shenai S, Sadani M, Sukhadia N, Jani M, Ajbani K, *et al.* Evaluation of the bactec MGIT 960 TB system for recovery and identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in a high volume tertiary care center. *Indian Journal on Medical Microbiology.* 2009;27(3):217-221.
- 68.- Singhal R, Arora J, Bhalla M, Lal P, Reza S, Behera D, *et al.* Presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex based on cord formation in BACTEC MGIT 960 medium. *Indian Journal on Medical Microbiology.* 2012;30(2):218-221.
- 69.- Garrigo M, Aragón LM, Alcaide F, Borell S, Cardeñosa E, Galán JJ. Multicenter Laboratory Evaluation of the MB/ BacT *Mycobacterium* Detection System and the BACTEC MGIT 960 System in Comparison with the BACTEC 460 TB System for Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology.* 2007;45(6):1766- 1770.
- 70.- Canetti G, Rist N, Grosset J. Measurement of sensitivity of the tuberculous bacillus to antibacillary drugs by the method of proportions. Methodology, resistance criteria, results and interpretation. *Rev Tuberc Pneumol.* 1963;27:217-272.
- 71.- Tagliani E, Cabibbe AM, Miotto P, Borroni E, Toro JC, Mansjö M, *et al.* Diagnostic Performance of the New Version (V2.0) of GenoType MTBDRs/ Assay for Detection of Resistance to Fluoroquinolones and Second- Line Injectable Drugs: a Multicenter Study. *J Clin Microbiol.* 2015;53(9):2961-2969.
- 72.- Kiraz N, Saglik I, Kiremitci A, Kasifoglu N, Akgun Y. Evaluation of the GenoType Mycobacteria Direct assay for direct detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex obtained from sputum samples. *Journal of Medical Microbiology.* 2010;59:930-934.
- 73.- Tortoli E, Nanetti A, Piersimoni C, Cichero P, Farina C, Mucignat G, *et al.* Performance assessment of new multiplex probe assay for identification of Mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 2001;39:1079–84.
-

- 74.- Bicmen C, Gunduz AT, Coskun M, Senol G, Cirak AK, Ozsos A. Molecular Detection and Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Four Clinically Important Nontuberculous Mycobacterial Species in Smear-Negative Clinical Samples by the GenoType Mycobacteria Direct Test. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(8):2874-2878.
- 75.- Dinnes J, Deeks J, Kunst H, Gibson A, Cummins E, Waugh N, *et al*. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technol Assess*. 2007;11:1–196.
- 76.- Takahashi T, Nakayama T. Novel technique of quantitative nested real-time PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis* DNA. *J Clin Microbiol*. 2006;44:1029–39.
- 77.- Held M, Laubscher M, Zar HJ, Dunn RN. GeneXpert polymerase chain reaction for spinal tuberculosis. *Bone Joint J*. 2014;96-B:1366-9.
- 78.- Maynard-Smith L, Larke N, Peters JA, Lawn SD. Diagnostic accuracy of the Xpert MTB/RIF assay for extrapulmonary and pulmonary tuberculosis when testing non- respiratory samples: a systematic review. *BMC Infectious Disease*. 2014;14:709.
- 79.- Bucheli JL, Garcia MM, Álvarez C, Palacio JJ, Pando A, Gagatek S, *et al*. Impact of the Xpert MTB/RIF molecular test on the late diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2014;18(4): 435-437.
- 80.- Huh HJ, Jeong BH, Jeon K, Koh WJ, Ki CS, Lee NY. Performance evaluation of the Xpert MTB/RIF assay according to its clinical application. *BMC Infectious Disease*. 2014;14:589.
- 81.- Eldholm V, Norheim G, Von der Lippe B, Kinander W, Dahle UR, Caugant DA. Evolution of extensively drug- resistant *Mycobacterium tuberculosis* from a susceptible ancestor in a single patient. *Genome Biology*. 2014;15:490
- 82.- Sun G, Luo T, Yang C, Dong X, Li J, Zhu Y, *et al*. Dynamic Population Changes in *Mycobacterium tuberculosis* During Acquisition and Fixation of Drug Resistance in Patients. *The Journal of Infectious Diseases*. 2012;206:1724-33.
- 83.- Caminero JA, ed. Guidelines for Clinical and Operational Management of Drug-Resistant Tuberculosis. Paris, France. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 2013.
- 84.- Alcaide F, Moreno E, González J, Palacios JJ. Métodos de determinación de sensibilidad a los antimicrobianos en micobacterias. 56. Procedimientos en Microbiología. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).2016.
- 85.- Caminero JA. Multidrug- resistant tuberculosis: epidemiology, risk factors and case finding. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2010;14(4):382-390.
- 86.- American Thoracic Society, Centers for Disease Control and Prevention and Infectious Diseases Society of America. Treatment of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:603–62.
- 87.- WHO. Treatment of tuberculosis: Guidelines for National Programmes, 3rd ed. Geneva: WHO; 2003.
- 88.- Mitnick C, Bayona J, Palacios E, Shin S, Furin J, Alcántara M, *et al*. Community-Based therapy for multidrug-resistant tuberculosis in Lima, Perú. *N Engl J Med*. 2003;348:119–28.
- 89.- Ramírez M, Pascual JF, Noguero A. Nuevos fármacos antituberculosos en la tuberculosis resistente y multirresistente. *Med Clin (Barc)*. 2013;141(7):306-313.

-
- 90.- Uso de la bedaquilina en el tratamiento de la tuberculosis multidrogorresistente. Guía provisional de políticas. Organización Mundial de la Salud. 2013.
- 91.- Maguire H, Brailsford S, Carless J, Yates M, Altass L, Yates S, *et al.* Large outbreak of isoniazid- monoresistant tuberculosis in London, 1995 to 2006: case- control study and recomendations. *Euro Surveill.* 2011;16(13):19830.
- 92.- Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tubercle and Lung Disease.* 1998;78:3–29.
- 93.- Crudu V, Stratan E, Romancenco E, Allerheiligen V, Hillemann A, Moraru N. First Evaluation of an Improved Assay for Molecular Genetic Detection of Tuberculosis as Well as Rifampin and Isoniazid Resistances. *Journal of Clinical Microbiology.* 2012;50(4):1264-1269.
- 94.- Singhal R, Myneedu VP, Arora J, Singh N, Bhalla M, Verma A, *et al.* Early detection of multidrug resistance and common mutations in isolates from Delhi using GenoType MTBDR*plus* assay. 2015 *Indian J Med Microbiol.* 2015;33(5):46-52.
- 95.- Espasa M, González-Martín J, Alcaide F, Aragón LM, Lonca J, Manterola JM, *et al.* Direct detection in clinical samples of multiple gene mutations causing resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampicin using fluorogenic probes. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55:860–5.
- 96.- Ruiz M, Torres MJ, Llanos AC, Arroyo A, Palomares JC, Aznar J. Direct detection of rifampin and isoniazide resistant *Mycobacterium tuberculosis* in auraminerhodamine- positive sputum specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1585–9.
- 97.- Neonakis IK, Gitti Z, Baritaki S, Petinaki E, Baritaki M, Spandidos DA. Evaluation of GenoType Mycobacteria Direct Assay in Comparison with Gen-Probe *Mycobacterium tuberculosis* Amplified Direct Test and Genotype MTBDR*plus* for Direct Deteccion of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology.* 2009;47(8):2601-2603.
- 98.- Kim SW, Kim SI, Lee SJ, L JH, Ryu YJ, Shim SS, *et al.* The Effectiveness of Real-Time PCR Assay, Compared with Microbiologic Results for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. *Tuber Respir Dis.* 2015;78:1-7.
- 99.- Park CK, Know YS. Respiratory Review of 2014: Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease. *Tuberc Respir Dis.* 2014;77:161-166.
- 100.- Aragón LM, Navarro F, Heiser V, Garrigó M, Español M, Coll P. Rapid detection of specific gene mutations associated with isoniazide or rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using non-fluorescent lowdensity DNA microarrays. *J Clin Microbiol.* 2006;57:825–31.
- 101.-Gu Y, Wang G, Dong W, Li Y, Ma Y, Shang Y, *et al.* Xpert MTB/RIF and GenoType MTBDR*plus* assays for the rapid diagnosis of bone and joint tuberculosis. *International Journal of Infectious Diseases.* 2016;36:e27-e30.
- 102.- Hillemann D, Rüsç-Gerdes S, Richter E. Feasibility of the GenoType MTBDR*sl* Assay for Fluoroquinolone, Amikacin-Capreomycin, and Ethambutol Resistance Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Strains and Clinical Specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2009;47(6):1767-1772.
- 103.- Warner DF, Mizrahi V. Translating genomics research into control of tuberculosis: lessons learned and future prospects. *Genome Biology.* 2014;15:514
-

- 104.- Comas I, Gil A. Secuenciación masiva para el diagnóstico y la epidemiología de tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016;34(Supl 3):32-39.
- 105.- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, *et al*. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998;393:537-544.
- 106.- Tyler AD, Christianson S, Knox NC, Mabon P, Wolfe J, Domselaar GV, *et al*. Comparison of simple Preparation Methods Used for the Next-Generation Sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE*. 2016;11(2);e0148676.
- 107.- Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M, *et al*. Out-of-Africa migration and Neolithic co-expansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nat.Genet*. 2013;45(10);1176-1182.
- 108.- Coscolla M, Gagneux S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Semin Immunol*. 2014;26(6):431-444.
- 109.- Coll F, McNerney R, Guerra-Assunção JA, Glynn JR, Perdigao JA, Viveiros M, *et al*. A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis* Complex strains. *Nature communications*. 2014;5:4812.
- 110.- Stucki D, M alla B, Hostettler H, Huna T, Feldmann J, Yeboah-Manu D, *et al*. Two New Rapid SNP-Typing Methods for Classifying *Mycobacterium tuberculosis* Complex into the Main Phylogenetic Lineages. *PLoS ONE*. 2012;7(7);e41253.
- 111.- Comas I, Chakravarti J, Small PM, Galagan J, Niemann S, Kremer K, *et al*. Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved. *Nat Genet*. 2010;42(6):498–503. doi:10.1038/ng.590.
- 112.- Coscolla M, Copin R, Sutherland J, Gehre F, Jong B, Owolabi O, *et al*. *M. tuberculosis* T Cell Epitope Analysis Reveals Paucity of Antigenic Variation and Identifies Rare Variable TB Antigens. *Cell Host & Microbe*. 2015;18;538–548.
- 113.- Walker TM, Ip CL, Harrell RH, Evans JT, Kapatai G, Dedicoat MJ, *et al*. Whole- genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(2);137-146.
- 114.- Walker TM, Lalor MK, Broad A, Saldana L, Morgan M, Parker L. Assessment of *Mycobacterium tuberculosis* transmission in Oxfordshire, UK 2007-12, with whole pathogen genome sequences: an observational study. *Lancet Respir Med*. 2014;2;285-92.
- 115.- Pérez-Lago L, Comas I, Navarro Y, González-Candelas F, Herraz M, Bouza E, *et al*. Whole Genome Sequencing Analysis of Inpatient Microevolution in *Mycobacterium tuberculosis*: Potential Impact on the Inference of Tuberculosis Transmission. *The Journal of Infectious Diseases*. 2014;209;98-108.
- 116.- Clark TG, Mallard K, Coll F, Preston M, Assefa S, Harris D. Elucidating Emergence and Transmission of Multidrug-Resistant Tuberculosis in Treatment Experienced Patients by Whole Genome Sequencing. *PLoS ONE*. 2013;8(12);e83012.
- 117.- Seifert M, Catanzaro D, Catanzaro A, Rodwell TC. Genetic Mutations Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A Systematic Review. *PLoS ONE*. 2015;10(3): e0119628. doi:10.1371/journal.pone.0119628

-
- 118.- Miotto P, Tessema B, Tagliani E, Chindelevitch L, Starks AM, Emerson C, *et al.* A standardised method for interpreting the association between mutations and phenotypic drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur Respir J.* 2017;50;1701354 [https://doi.org/10.1183/13993003.01354 2017].
- 119.- Horne DJ, Pinto LM, Arentz M, Grace Lin SY, Desmond E, Flores LL, *et al.* Diagnostic Accuracy and Reproducibility of WHO-Endorsed Phenotypic Drug Susceptibility Testing Methods for First- Line Second- Line Antituberculosis Drugs. *Journal of Clinical Microbiology.* 2014;51(2):393-401.
- 120.- Miotto P, Cabibbe AM, Feuerriegel S, Casali N, Drobniewski F, Rodionova Y, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* Pyrazinamide Resistant Determinants a: Multicenter Study. *mBio.* 2014;5(5):e01819-14.
- 121.- Angeby K, Juréen P, Kahlmeter G, Hoffner SE, Schön T. Challenging a dogma: antimicrobial susceptibility testing breakpoints for *Mycobacterium tuberculosis*. *Bull World Health Organ.* 2012;90:693-
- 122.- Xu Y, Jia H, Huang H, Sun Z, Zhang Z. Mutations Found in *embCAB*, *embR*, an *ubiA* Genes of Ethambutol-Sensitive and -Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from China. *BioMed Research International.* 2015; Article ID 951706, 8 pages.
- 123.- Comas I, Borrell, Roetzer A, Rose G, Malla B, Kato-Maeda M, *et al.* Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes. *Nature Genetics.* 2012;44(1):106-112.
- 124.- Murray PR, Washington JA. Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. *Mayo Clin Proc.* 1975;50(6):339-344.
- 125.- Steiner A, Stucki D, Coscolla M, Borrell S, Gagneux S. Kvarq: targeted and direct variant calling from fastq reads of bacterial genomes. *BMC Genomics.* 2014;15:881
- 126.- Feuerriegel S, Schleusener V, Beckert P, Hohl TA, Miotto P, Cirillo DM, *et al.* PhyResSE: a Web Tool Delineating *Mycobacterium tuberculosis* Antibiotic Resistance and Lineage from Whole- Genome Sequencing Data. *J Clin Microbiol.* 2015;53(6):1908-14. doi:10.1128/JCM.00025-15.
- 127.- Informes de salud: Informe de tuberculosis en la Comunitat Valencina año 2005. Nº 97. Edita: Generalitat Valencia, Conselleria de Sanitat. 1ª edición.
- 128.- Garrido A, Salvo S, Gil J, Sanjoaquin I, Sánchez E, Vitoria A. Estudio de los aislamientos de micobacterias no tuberculosas y su significado clínico (periodo 2000- 2013). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32(Supl 1):100.
- 129.- Martínez S, Alba LM, Rodríguez, Alonso JA, García JM, Palacios JJ, *et al.* Micobacterias no tuberculosas aisladas en Asturias durante el período 2005- 2012. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016;34(Supl E1):226-227.
- 130.- Cano-Portero R, Amillategui-dos Santos R, Boix-Martínez R, Larrauri-Cámara A. Epidemiología de la tuberculosis en España. Resultados obtenidos por la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica en el año 2015. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2018;36(3):179-186.
- 131.- Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya. La tuberculosis marca un mínimo histórico en Cataluña tras caer un 65% en dos décadas. *JANO.es.* 10 Junio 2013.

- 132.- Gomila B, Laparra P, Sabater S, Pardo FJ, Marín M, Romeu MA, *et al.* Evolución de las resistencias y análisis de las características clínico-epidemiológicas de la tuberculosis en la provincia de Castellón (2008-2012). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32(Supl 1):96.
- 133.- García M, Pérez MC, Cifuentes C, Mir I, Payeras A, Serrano A, *et al.* Tuberculosis en un área de Mallorca. Casos diagnosticados en el Hospital San Llätzer en el periodo 2003-2011. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(Supl C):170.
- 134.- Espínola M, Domingo D, García J, Serrano C, Alonso M, López-Brea M. Aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis* Complex en la última década en un hospital madrileño. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(Supl C):170-171.
- 135.- Portu J, Santamaría M, Arroita G, Sáez de Adana E, Ceberio L, Garro L, *et al.* Evolución de los casos de tuberculosis (TB) en la provincia de Álava en el periodo 2003-2010. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(Supl C):176.
- 136.- Saavedra JM, Domínguez AM, Márquez A, De la Iglesia A, Franco F, Pérez JA, *et al.* Tuberculosis. Aspectos clínicos y epidemiológicos entre 1996 y 2012. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(Supl E1):133.
- 137.- Muñoz MJ, Marín I, Nuñez ML, Andrades M, Marín AJ, Altuna A. Situación de la resistencia a fármacos en aislados del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en el Hospital General Universitario Reina Sofía de Murcia. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32(Supl 1):100.
- 138.- Cucurull J, Vega S, Sabaté M, Follia N, Gassiot P, Camps N. Diferencias en la enfermedad tuberculosa (TB) según la edad en la primera década del siglo XXI. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(Supl C):175.
- 139.- Soria P, Monforte ML, Samper S, Lain E, Vidal M, Revillo MJ. Estudio de los casos de tuberculosis infantil diagnosticados en el hospital universitario Miguel Servet en un periodo de 12 años. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33(Supl E1):184-185.
- 140.- Santiago B, Blázquez D, Baquero F, Noguera A, Vallmanya T, Soriano A, *et al.* Perfil epidemiológico, clínico y microbiológico de la tuberculosis pediátrica en España: primer año de la red española de estudio de tuberculosis pediátrica (pTBred). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33(Supl E1):146-147.
- 141.- Santiago B, Francisco L, Baquero F, Noguera A, Santos MDM, Vallmaya A, *et al.* Características de la tuberculosis infantil en España. Estudio prospectivo de la red española de estudio de tuberculosis pediátrica- pTBred. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017;35(Supl E1):70.
- 142.- Gil A, Comas I, Calabuig E, Broseta A, González F, Córdoba J, *et al.* Caracterización de la enfermedad por *Mycobacterium tuberculosis* en inmigrantes en un hospital de Valencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32(Supl 1):104.
- 143.- Gallego C, García M, Pérez MC, Raya M, Hernández A, Salom A, *et al.* Tuberculosis en pacientes infectados por el VIH en un área de Mallorca 2002-2012. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(Supl E1):122-123.
- 144.- Bermúdez MP, De Toro I, Mediavilla C, Fernández AM, Duran MS, Palop B. Tuberculosis en inmigrantes en el área sanitaria del Hospital Carlos Haya (2000-2011). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(Supl C):178-179.
- 145.- Fortun J, Martin P, Navas E, López R, Pintado V, Cobo J, *et al.* Changes in the epidemiology of tuberculosis: the influence of international migration flows. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(9):654-659.

-
- 146.- Paz M, Navarro M, Espasa M, Silva D, Sala M, Navarro G, *et al.* Características clínico-epidemiológicas y estudio de resistencias antimicrobianas en pacientes africanos diagnosticados de tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(Supl E1):125.
- 147.- Nistal S, Álvarez T, Asenjo M, Vicente C, Asenjo A, Sendin V, *et al.* Tuberculosis y VIH: Evolución en pacientes ingresados entre 2001 y 2011 en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33(Supl E1):182-183.
- 148.- Candel C, Guerrero C, Casañ C, Bravo J, Lozano L, Pérez AB, *et al.* Evolución de la tuberculosis en un área de Murcia (1995-2012). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32(Supl 1):107.
- 149.- González-Ruano P, Pascual JF, Ramírez M, Martínez M, Carrillo R, Jaras MJ, *et al.* Estudio descriptivo retrospectivo comparativo de los pacientes con/ sin infección por VIH ingresados en una unidad de aislamiento de tuberculosis durante el periodo 2002- 2011. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33(Supl E1):183.
- 150.- Monforte ML, Lezcano MA, Ramos C, Casanova P, Pereira J, Ruiz S, *et al.* Resistencias de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), relación con la inmigración y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(Supl E1):130.
- 151.- Navascués A, Gil-Setas A, Rubio T, Ezpeleta C. Tuberculosis pulmonar y extrapulmonar; ¿hay diferencias en su patrón de resistencia? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(Supl C):171.
- 152.- Ferrero OL, Viteri A, Ruiz B, López I, Ibarra S, Baraia-Etxaburu JM, *et al.* Tuberculosis peritoneal/ mesentérica en pacientes con infección VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32(Supl 1):103.
- 153.- García C, Azcona JM, Casanas M, Ugalde E, Ibarra V, Metola L, *et al.* Tuberculosis extrapulmonar en la Rioja: características clínicas y epidemiológicas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(Supl E1):130-131.
- 154.- Ramón JL, Gómez M, Gil de Gómez MJ, Blanco JR. Demora en el aislamiento respiratorio de los pacientes con tuberculosis pulmonar en un hospital de referencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(Supl E1):108-109.
- 155.- Navascués A, Aróstegui BC, Gil-Setas A, Rubio T, Ezpeleta C. Revisión de las características de la tuberculosis extrapulmonar. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(Supl C):172.
- 156.- García Z, Gomila B, Sabater S, Laparra P, Pardo FJ, Moreno R. Tuberculosis extrapulmonar: revisión de casos diagnosticados en la provincia de Castellón (2008-2014). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33(Supl E1):146.
- 157.- Samper S, González-Martín J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones causadas por el género *Mycobacterium*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2018;36(2):104-111.
- 158.- Domínguez MDC, Gómez MDC, Figueroa E, Roldan ME. Optimización en la recuperación de especies de Micobacterias en cultivo en medio líquido. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(Supl E1):120-121.
- 159.- Sorlozano A, Soria I, Roman J, Huertas P, Soto MJ, Piedrola G, *et al.* Comparative Evaluation of Three Culture Methods for the Isolation of Mycobacteria from Clinical Samples. *Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2009;19(10):1259–1264.

- 160.- Borrás M, Burgos A, Martínez O, Gil J, Colomina J. ¿Siguen siendo necesarios los medios de cultivo sólidos para aislamiento-recuperación de micobacterias? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(Supl E1):124.
- 161.- Machuca J, Delgado M, Bellido M, Fernández P, Batista N, Pascual A. Aplicación de un test inmunocromatográfico rápido en el diagnóstico de infecciones por *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(Supl E1):110.
- 162.- Safianowska A, Walkiewicz R, Nejman-Gryz P, Chazan R, Grubek-Jaworska H. Diagnostic utility of the molecular assay GenoType MTBC (HAIN Lifescience, Germany) for identification of tuberculous mycobacteria. *Pneumonol.Alergol.Pol.* 2009;77(6):517-520.
- 163.- Richter E, Weizenegger M, Rüscher-Gerdes S, Niemann S. Evaluation of GenoType MTBC Assay for Differentiation of Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates. *Journal of Clinical Microbiology.* 2003;41(6):2672-2675.
- 164.- Somoskovi A, Dormandy J, Rivenburg J, Pedrosa M, McBride M, Sifinger M. Direct Comparison of the GenoType Distinguish between Members of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Clinical Isolates and in Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology.* 2008;46(5):1854-1857.
- 165.- Miller MB, Popowitch EB, Backlund MG, Ager EPC. Performance of Xpert MTB/RIF RUO Assay and IS6110 Real-Time PCR for *Mycobacterium tuberculosis* Detection in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology.* 2011;49(10):3458-3462.
- 166.- Vidal M, Monforte ML, Lezcano MA, Ruiz S, Palacian MP, Samper S, *et al.* Caracterización molecular de los aislados de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente en el Hospital Universitario Miguel Servet en el periodo 2000- 2013. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32(Supl 1):106.
- 167.- Vicente D, De la Caba I, Santacatterina E, Basterretxea M, Pérez E. Susceptibilidad antimicrobiana de 1.806 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en Gipuzkoa entre 2000 y 2015. Estudio genético de las cepas resistentes. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016;34(Supl E1):148.
- 168.- Garrido AI, Salvo S, González M, Sanjoaquin I, Vitoria A. Estudio de las resistencias de *M. tuberculosis* en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza durante el periodo 2000-2012. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(Supl E1):119.
- 169.- Jover D, Sanchez G, Leon R, Galvis D, Mateo I, Pinagorte H, *et al.* Estudio descriptivo de casos de tuberculosis multirresistentes en dos hospitales de la Comunidad Calenciana. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(Supl E1):123.
- 170.- Martín A, Cacho J, Martín MA, Pérez A, Grupo de trabajo de la Unidad de Tuberculosis del área 10 Hospital Universitario de Getafe. Emergencia de aislados de *Mycobacterium tuberculosis* Complex resistentes a rifampicina y sensibles a isoniazida. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(Supl C):172-173.
- 171.- Gaspar G, González P, Pérez AM, Ramos A, Ramos JT, Rodríguez S, *et al.* Emergencia de aislados de *Mycobacterium tuberculosis* Complex resistentes a rifampicina y sensibles a isoniazida. *Cartas científicas/ Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(7):486-492.
- 172.- Kurbatova EV, Cavanaugh JS, Sarita N, Wright A, Kim H, Metchock B, *et al.* Rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: susceptibility to isoniazid and other anti-tuberculosis drugs. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2012;16(3):355-357.

-
- 173.- Kumari R, Tripathi R, Pandey AP, Banerjee T, Sinha P, Anupurba S. Rapid Screening of MDR-TB in Cases of ExtraPulmonary tuberculosis Using GenoType MTBDR*plus*. PLoS ONE. 2016;11(7):e0159651.
- 174.- Vitoria A, Garrido AI, Montes N, Berges A, Escartin R, González M. Detección genética de resistencias a isoniazida y rifampicina en cepas del complejo *M. tuberculosis*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013;31(Supl E1):109.
- 175.- Cuevas B, Zenteno R. Tuberculosis drogorresistente: mecanismos moleculares y métodos diagnósticos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;28(9):621–628.
- 176.- Alcaide F, Santín M. Tuberculosis multirresistente. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2008;26(Supl 13):54-60.
- 177.- Lanzas F, Loerger TR, Shah H, Acosta W, Karakousis PC. First Evaluation of GenoType MTBDR*plus* 2.0 Performed Directly on respiratory Specimens in Central America. J. Clin Microbiol. 2016;54:2498-2502.
- 178.- Lu W, Feng Y, Jianming Wang, Zhu L. Evaluation of MTBDR*plus* and MTBDR*s/l* in Detecting Drug-Resistant Tuberculosis in a Chinese Population. Disease Markers. 2016;Article ID 2064765, 9pages
- 179.- Seifert M, Catanzaro D, Catanzaro A, Rodwell TC. Genetic Mutations Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS ONE. 2015;10(3): e0119628.
- 180.- Brossier F, Veziris N, Aubry A, Jarlier V, Sougakoff W. Detection by GenoType MTBDR*s/l* Test of Complex Mechanisms of resistance to Second-Line Drugs and Ethambutol in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates. J.Clin.Microbiol. 2010;48(5):1683-1689.
- 181.- Theron G, Peter J, Richardson M, Barnard M, Donegan S, Warren R, *et al.* The diagnostic accuracy of the GenoType MTBDR*s/l* assay for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2014; Issue 10. Art. No.: CD010705. DOI: 10.1002/14651858.
- 182.- Tukvadze N, Bablishvili N, Apsindzelashvili R, Blumberg HM, Kempker RR. Performance of the MTBDR*s/l* Assay in the Country of Georgia. Int J Tuberc Lung Dis. 2014;18(2):233-239.
- 183.- Brossier F, Guindo D, Pham A, Reibel F, Sougakoff W, Veziris N, *et al.* Performance of the New Version (v2.0) of the GenoType MTBDR*s/l* Test for Detection of Resistance to Second-Line Drugs in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains. J Clin Microbiol. 2016;54:1573-1580.
- 184.- Said HM, Kock MM, Ismail NA, Baba K, Omar SV, Osman AG, *et al.* Evaluation of the GenoType MTBDR*s/l* assay for susceptibility testing of second –line anti-tuberculosis drugs. Int J Tuberc Lung Dis. 2012;16(1):104-109.
- 185.- Losa C, Ibáñez MA, Armendariz L, Rúa M, Catejon S, Bustos C, *et al.* Impacto del empleo de distintos métodos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos en el tratamiento de *Mycobacterium tuberculosis* Complex. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2016;34(Supl E1):148-149.
- 186.- Alba LM, Martínez S, Rodríguez C, Alonso JA, García JM, Palacios JJ, *et al.* Evaluación de métodos fenotípicos y genotípicos para la detección de resistencias a fármacos de primera línea en cepas de *M. tuberculosis* aisladas en Asturias (2004-2015). Enferm Infecc Microbiol Clin. 2016;34(Supl E1):218-219.
-

- 187.- Opota O, Senn L, Prod'hom G, Mazza-Stalder J, Tissot F, Greub G, *et al.* Added value of molecular assay Xpert MTB/RIF compared to sputum smear microscopy to assess the risk of tuberculosis transmission in a low-prevalence country. *Clinical Microbiology and Infections*. 2016;22: 613-619.
- 188.- Agrawal M, Bajaj A, Bhatia V, Dutt S. Comparative study of GeneXpert with ZN Stain and Culture in Samples of Suspected Pulmonary Tuberculosis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2016;10(5):DC09-DC12.
- 189.- Herráez O, Asencio MA, Huertas M, Carranza R, Castellanos J, Franco M, *et al.* Estudio de coste- efectividad del diagnóstico microbiológico de tuberculosis mediante GeneXpert MTB/RIF. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2016.06.009>
- 190.- Moure R, Martin R, Alcaide F. Effectiveness of an Integrated Real-Time Method for Detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Smear-Negative Extrapulmonary Samples in a Area of Low Tuberculosis Prevalence. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50(2):513-515.
- 191.- Armand S, Vanhuls P, Delcroix G, Courcol R, Lemaitre N. Comparison of the Xpert MTB/RIF Test with an IS6110-TaqMan Real-Time PCR Assay for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Respiratory and Nonrespiratory Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(5):1772-1776.
- 192.- Marlowe EM, Novak-Weekley SM, Cumpio J, Sharp SE, Momeny MA, Babst A. Evaluation of the Cepheid Xpert MTB/RIF Assay for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Respiratory Specimens. *Journal of Clinical. Microbiology*. 2011;49(4):1621-1623.
- 193.- Bajrami R, Mulliqi G, Kurti A, Lila G, Raka L. Comparison of GeneXpert MTB/RIF and conventional methods for the diagnosis of tuberculosis in Kosovo. *J Infect Dev Ctries*. 2016;10(4):418-422.
- 194.- Viñuelas-Bayón J, Vitoria MA, Samper S. Diagnóstico rápido de la tuberculosis. Detección de mecanismos de resistencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017;35(8):518-526.
- 195.- Benítez MA, Vallès C, Moure R, Alonso C, Cebollero A, Clivillé R. Utilidad del sistema Genxpert para el diagnóstico rápido de tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30(Supl C):181-182.
- 196.- Nebreda T, Remacha A, Parras T, Panero C, Carreno R. Efectividad de Xpert MTB/Rif para el diagnóstico de tuberculosis en muestras clínicas con baciloscopia negativa. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31(Supl E1):114.
- 197.- Moure R, Soldevila L, Camprubi D, Martin R, Santín M. Diagnóstico rápido de la tuberculosis y resistencia a la rifampicina: experiencia de 3 años con el sistema GeneXpert en un hospital de tercer nivel. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31(Supl E1):121.
- 198.- Freyre C, Martínez C, Rodiere K, Jesús de la Calle I, Pérez S. Incidencia de tuberculosis en los últimos 3 años en el área del Hospital Universitario de Puerto Real (Cádiz). Introducción de una PCR a tiempo real en muestra directa. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31(Supl E1):123-124.
- 199.- Saeed M, Iram S, Hussain S, Ahmed A, Akbar M, Aslam M. GeneXpert: A new tool for the rapid detection of rifampicin resistance in mycobacterium tuberculosis. *J Pak Med Assoc*. 2017;67(2):270-274.

-
- 200.- Guerrero MD, Miqueleiz A, Santa C, Domingo D, Cardeñoso L. Eficacia de la técnica Xpert MTB/RIF en el diagnóstico de la Tuberculosis en el Hospital Universitario de la princesa. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016;34(Supl E1):220.
- 201.- Lora V, Pérez ML, Rodríguez G, Gutiérrez M. Método automatizado de reacción en cadena de la polimerasa como apoyo diagnóstico de la tuberculosis en hospedadores pediátricos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017;35(Supl E1):73-74.
- 202.- Tang T, Liu F, Lu X, Huang Q. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for detecting *Mycobacterium tuberculosis* in a hospital in China. *Journal of International Medical Research.* 2017;45(2):816-822.
- 203.- Rahman A, Sahrin M, Afrin S, Earley K, Ahmed S, Rahman SMM. Comparison of Xpert MTB/RIF Assay and GenoType MTBDR*plus* DNA Probes for Detection of Mutations Associated with Rifampicin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One.* 2016; 11(4):e0152694.
- 204.- Guimeno A, Comas I, Cancino I, Coy J, Gosálvez C, Sánchez LM, *et al.* Aplicaciones de la secuenciación masiva al estudio de la tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017;35(Supl E1):227.
- 205.- Comas I, Cancino I, y Grupo de trabajo de la Tuberculosis de la Comunidad Valenciana. Secuenciación Genómica masiva para la epidemiología y diagnóstico de la tuberculosis: estudio a escala poblacional en la Comunidad Valenciana. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016;34(Supl E1):147.
- 206.- Galagan JE. Genomic insights into tuberculosis. *Nature Reviews Genetics.* 2014;15(5):307-320.
- 207.- Tyler AD, Christianson S, Knox NC, Mabonn P, Wolfe J, Van Domselaar G, *et al.* Comparison of Sample Preparation Methods Used for the Next Generation Sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE.* 2016;11(2):e0148676.
- 208.- Gil A, Comas I, Calabuig E, Broseta A, González F, Córdoba J, *et al.* Caracterización de la enfermedad por *Mycobacterium tuberculosis* en inmigrantes en un Hospital terciario de Valencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32(Supl 1):103.
- 209.- Walker TM, Clp CL, Harrell RH, Evans JT, Kapatai G, Dedicoat MJ, *et al.* Whole genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. *Lancet Infect Dis.* 2012;13(2):137-146.
- 210.- Torres JN, Lynthia VP, Rodwell TC, Victor TC, Amallraja AM, Elghraoui A, *et al.* Novel *katG* mutations causing isoniazid resistance in clinical *M. tuberculosis* isolates. *Emerging Microbes and Infections.* 2015;4:e42; doi:10.1038.