



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudio de las resistencias a los fármacos y los mecanismos moleculares más frecuentes en *Mycobacterium tuberculosis* complex en España

Daniel Pérez Risco

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



**Estudio de las resistencias a los fármacos y los mecanismos moleculares
más frecuentes en *Mycobacterium tuberculosis* complex en España**

Memoria presentada por Daniel Pérez Risco, para optar al grado de Doctor, por la
Universidad de Barcelona

Programa de Doctorado en Medicina e Investigación Translacional

Línea de Investigación: Patología infecciosa y trasplante

Facultat de Medicina, Campus Bellvitge – Departament de Patologia i Terapèutica

Experimental

Hospital Universitari de Bellvitge

Vº Bº del Director de Tesis

Dr. Fernando Alcaide Fernández de Vega

Professor Agregat de la Universitat de Barcelona

Departament de Patologia i Terapèutica Experimental

Doctorando

Daniel Pérez Risco

L'Hospitalet de Llobregat, abril de 2021



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



Bellvitge
Hospital Universitari

Departament de Micobacteris. Servei de Microbiologia.

Hospital Universitari de Bellvitge.

Departament de Patologia i Terapèutica Experimental.

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. Campus de Bellvitge.

Universitat de Barcelona.

El Dr. Fernando Alcaide Fernández de Vega, Jefe de Estudios del Grado de Medicina de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut-Campus Bellvitge, Profesor Agregado del Departament de Patologia i Terapèutica Experimental de la Universidad de Barcelona, y responsable del Laboratorio de Micobacterias del Hospital Universitari de Bellvitge,

HACE CONSTAR:

Que el trabajo experimental y la redacción de la memoria de tesis doctoral titulada: **“Estudio de las resistencias a los fármacos y los mecanismos moleculares más frecuentes en *Mycobacterium tuberculosis* complex en España”** han sido realizados por Daniel Pérez Risco, y considera que es apto para la lectura y defensa pública delante de un tribunal, para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Barcelona.

Y para dejar constancia, firma el presente documento.

L'Hospitalet de Llobregat, 7 de abril de 2021

Dr. Fernando Alcaide Fernández de Vega



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



Bellvitge
Hospital Universitari

Departament de Micobacteris. Servei de Microbiologia.

Hospital Universitari de Bellvitge.

Departament de Patologia i Terapèutica Experimental.

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. Campus de Bellvitge.

Universitat de Barcelona.

El Dr. Fernando Alcaide Fernández de Vega, Jefe de Estudios del Grado de Medicina de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut-Campus Bellvitge, Profesor Agregado del Departament de Patologia i Terapèutica Experimental de la Universidad de Barcelona, y responsable del Laboratorio de Micobacterias del Hospital Universitari de Bellvitge,

HACE CONSTAR que el trabajo experimental y la redacción de la memoria de tesis doctoral titulada: **“Estudio de las resistencias a los fármacos y los mecanismos moleculares más frecuentes en *Mycobacterium tuberculosis* complex en España”** han sido realizados por Daniel Pérez Risco, y se trata de una tesis en formato clásico con 1 artículo anexo:

Perez-Risco D, Rodriguez-Temporal D, Valledor-Sanchez I, Alcaide F. Evaluation of the Xpert MTB/RIF Ultra assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in smear-negative Extrapulmonary Samples. J Clin Microbiol. 2018. 56:e00659-18.

Factor de impacto: 4,959. (Primer Cuartil; Q1)

Y para dejar constancia, firma el presente documento.

L'Hospitalet de Llobregat, 7 de abril de 2021

Dr. Fernando Alcaide Fernández de Vega

A mis padres y a Alba.

*Al Dr. Carrer.
Allà on siguis, Víctor,
espero que t'agradi.*

AGRADECIMIENTOS

Cuando me decidí a realizar la tesis doctoral y lo comenté en mi círculo de amistades, algunas y algunos de ellos también estudiantes de doctorado, estos me solían decir las mismas cosas: “no sabes dónde te metes”, “¿Estás seguro de esta decisión?” o una mezcla resumida de ambas cosas con un simple “¡Ánimo, Dani...!”. Tras estos años, he de decir que una tesis doctoral es realmente dura, pero también muy gratificante: he crecido como investigador y he madurado como persona a lo largo de este periodo. Obviamente, no todo es perfecto ni las cosas salen como uno siempre desea y, como en todo, hay momentos de frustración, de agotamiento y de flaqueza... pero el resultado final lo compensa absolutamente todo. Esa comunicación, ese artículo, ese capítulo, esa conclusión, ese granito de arena aportado a la comunidad científica lo compensa con creces y, tras esos días algo grises, me consigue sacar una sonrisa.

En primer lugar, agradecer a mi director de tesis, el Dr. Fernando Alcaide, por haberme acogido como su pupilo. Aún recuerdo perfectamente el primer día que lo vi en una charla y fue entonces cuando me dije que él sería un perfecto director de tesis para mí. Ha sido increíblemente paciente conmigo. Después de estos años sigo quedándome embobado al escucharle hablar. Si bien es cierto que su crítica, perfección y finura al escribir es inalcanzable, creo que ahora soy más crítico y más duro, además de tener más soltura en la redacción de textos científicos.

A la Dra. M. Ángeles Domínguez, por permitir realizar la tesis doctoral en el Servicio de microbiología del Hospital Universitari de Bellvitge (HUB), así como prestar su ayuda cuando se le la he solicitado.

Dentro del HUB, quería agradecer especialmente la labor del Dr. Miguel Santín, sobre todo por su participación de algunos estudios. Es un excelente clínico y un grandísimo orador. No quiero olvidarme de Raquel Moure, parte importante de esta tesis: ahora entiendo la magnitud de tu trabajo en el hospital y doy fe de que has sido y eres una de las mejores, sino la mejor, doctoranda que ha pasado por micobacterias, tanto a nivel personal como profesional. También agradecer a los facultativos y técnicos de virus por permitirme utilizar sus instalaciones, facultativos y residentes como Damaris o Guillem por su ayuda en momentos puntuales, y a todo el grupo de recerca (los

becarios) del IDIBELL especialmente en el tramo final de esta tesis. Muchas gracias a Yanik y Anna por su tiempo y sus indicaciones, así como también a Dani, Aida, Sara y Meri. Gracias también a Miguel Fernández por su apoyo, ánimo y amabilidad: ojalá nuestros caminos se hubieran cruzado antes.

Una gran parte de este trabajo hubiera sido imposible sin la ayuda de los técnicos del laboratorio de micobacterias. Con el paso de los años estoy más convencido de que su figura se encuentra infravalorada. Un día encontré un meme que describe a la perfección como los doctorandos los vemos a ellos/as: como un GPS que te guía, te indica y te acompaña durante tu inicio para que llegues a tu destino correctamente. Muchas gracias a las chicas de BK (Erika y Neus) por su colaboración. Neus, siempre recordaré nuestras charlas y divagaciones de ciencia-ficción. Me alegra también haber conocido a Iván Peydro: tienes un gran corazón, Rick. También quiero agradecer a aquellos que pasaron por micobacterias y que dejaron un bonito recuerdo en mí: Miriam Valbuena, Edu Struzka (ya sabes que contigo me llevo una bonita amistad), y a Iván Sánchez, fundamental en uno de los capítulos de este trabajo.

Ningú millor per entendre això que en David. Aquests anys han sigut més fàcils amb tu al costat, sabent que no estava sol. Gràcies per haver sigut un grandíssim company, per transmetre calma i tranquil·litat en tot moment, així també com per ser crític quan ha sigut necessari. Crec que hem fet bon "equip" i ens ho hem passat molt bé junts.

A mis amistades fuera del hospital, por tratar de comprender lo que hacía y darme ánimos, como han hecho l@s de "Farmacia de Guardia", y especialmente Xevi, Laura, Sara y Albert. También a los "doc", que me han ayudado con sus consejos: Marta Gómez, Jose y Alejandro Picazo. Y, por supuesto, también a Gerard (*bro*) y Laura: habéis dotado de personalidad y color esta tesis.

Als meus companys de la Farmàcia Poble Sec de Cardedeu. La flexibilitat i comprensió que l'Anna m'ha donat per realitzar la tesi durant els anys han sigut increïbles. Sempre t'ho he dit, però vull que quedi per escrit: tant de bo algun dia sigui tan bon "jefe" com tu ho has sigut amb mi. Valoro i aprecio molt el teu tracte i la teva intel·ligència emocional en els meus mals moments. Diuen que si t'agrada el que fas no és treball, i part de la culpa l'han tingut la Mercè, en Jordi i l'Aina. Les tardes amb vosaltres han

sigut genials: heu sigut el meu oasi de divertida i, sobretot, feliç desconnxió, en un entranyable barri que ja sento com a meu.

A mi familia, en especial a mis padres, mecenas en esta tesis doctoral y referentes en mi vida. Soy un afortunado por teneros a mi lado, gracias por vuestro amor y cariño infinito.

A Garfield y a Dante, por recordarme en cada momento qué es lo realmente importante en esta vida.

Y, sobre todo, a Alba. Me faltan palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí, todo el esfuerzo invertido, así como toda la paciencia que has tenido y toda esa fe infinita que has depositado siempre en mí. Gracias por haber permitido esta realización personal, eres increíble. Sin ti, este sueño no hubiera sido posible.

ÍNDICE

Índice

ÍNDICE.....	XIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XXIII
ABREVIATURAS	XXVII
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	25
1.1. Género <i>Mycobacterium</i>	27
1.1.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	28
1.1.2. <i>Mycobacterium leprae</i>	29
1.1.3. Micobacterias no tuberculosas	30
2. TRANSMISIÓN Y PATOGENIA DE LA TUBERCULOSIS	31
2.2. Patogenia: conceptos generales	32
2.3. Patogenia: Hipótesis dinámica	35
2.4. Comorbilidades de tuberculosis y factores de riesgo	35
3. EPIDEMIOLOGIA Y TRANSMISIÓN	39
3.1.1. Situación de la tuberculosis en el mundo	39
3.1.2. Situación de la tuberculosis en Europa	41
3.1.3. Situación de la tuberculosis en España	42
3.2. Flujos migratorios.....	43
3.3. Estudios epidemiológicos de la transmisión: Tipado molecular	44
4. CUADRO CLÍNICO	47
4.1. Tuberculosis pulmonar	47
4.2. Tuberculosis extrapulmonar	48
5. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN TUBERCULOSA.....	50
5.1. Prueba cutánea de la tuberculina	50
5.2. Técnicas <i>in vitro</i> basadas en la detección de IFN- γ	52
6. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS	53
6.1. Muestras: Procesamiento, digestión y descontaminación	53
6.2. Baciloscopia: observación microscópica	54
6.4. Cultivo.....	56
6.5. Identificación	59
7. FÁRMACOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA.....	65

7.1. Fármacos de primera línea	67
7.2. Fármacos de segunda línea	70
7.3. Otros fármacos antituberculosos	72
8. TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS.....	73
8.1. Pauta inicial	75
8.2. Pauta situaciones especiales	75
8.3. MDR-TB y XDR-TB.....	76
8.4. Quimioprofilaxis	77
9. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A LOS FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS	78
9.1. Métodos fenotípicos	79
9.2. Métodos de detección rápida de la resistencia antibiótica	84
10. VACUNAS.....	92
JUSTIFICACIÓN	96
OBJETIVOS	102
CAPÍTULO 1.....	106
Estudio de las resistencias a los fármacos y los mecanismos moleculares más frecuentes en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex en España durante el periodo 2016-2018 (Estudio REMOTUBES)	
Introducción	108
Materiales y métodos	111
Diseño del estudio.....	111
Recogida y análisis de los datos	111
Estudio microbiológico	112
Análisis estadístico	115
Aspectos éticos.....	115
Resultados.....	116
Distribución geográfica y características socio-demográficas	116
Resistencia a los fármacos y mecanismos moleculares de resistencia.....	117
Resistencias cruzadas	122
MDR-TB y factores de riesgo.....	122
Resistencia primaria o inicial (sin tratamiento previo) y secundaria o adquirida (con tratamiento previo).....	124
Resultado del tratamiento	125
Discusión	126
CAPÍTULO 2.....	136

Estudio evolutivo de las resistencias a los fármacos antituberculosos en España (2006-2016)

Introducción	138
Materiales y métodos	140
Diseño del estudio	140
Análisis de los datos	141
Estudio microbiológico	141
Análisis estadístico	142
Aspectos éticos	142
Resultados	143
Resistencia y características socio-demográficas	146
Distribución geográfica y temporal de los casos	150
Resistencia primaria y secundaria	151
Patrones de resistencia a los fármacos antituberculosos	152
Resistencia a la Pirazinamida	156
Resultado del tratamiento	159
Discusión	160
CAPÍTULO 3	168
Evaluación del Xpert MTB/RIF Ultra para la detección simultánea de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex y de la resistencia a la Rifampicina en muestras extrapulmonares baciloscopia-negativa	
CAPÍTULO 4	176
Evaluación del Anyplex II MTB/MDR/XDR para la detección rápida de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex y de las resistencias relacionadas con los principales fármacos antituberculosos	
Introducción	178
Materiales y métodos	181
Muestras y diseño del estudio	181
GenoType	182
Anyplex	182
Secuenciación del ADN	185
Resultados	185
Discusión	189
DISCUSIÓN GLOBAL	194
CONCLUSIONES	208

BIBLIOGRAFIA	212
ANEXO.....	248

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los fármacos antituberculosos. _____	66
Tabla 2. Resumen de los principales esquemas terapéuticos empleados en el tratamiento de la tuberculosis. _____	78
Tabla 3. Características socio-demográficas de los pacientes del estudio REMOTUBES (N=930). _____	118
Tabla 4. Características clínicas de los pacientes del estudio REMOTUBES (N=930). _____	119
Tabla 5. Resistencia a los fármacos antituberculosos en el estudio REMOTUBES según el tipo de resistencia (N=930). _____	120
Tabla 6. Lista de las mutaciones identificadas por GenoType MTBDR <i>plus</i> y Anyplex MTB/MDR/XDR en los genes <i>rpoB</i> , <i>katG</i> e <i>inhA</i> en la población con resistencia a algún fármaco antituberculoso de primera línea (N=122). _____	122
Tabla 7. Factores de riesgo asociados a la tuberculosis multirresistente (MDR-TB). _____	123
Tabla 8. Casos con resistencia a la Isoniacida y casos MDR-TB en función de si recibieron o no tratamiento previo, y según el país de origen de los pacientes (N=930). _____	124
Tabla 9. Listado de los centros hospitalarios participantes en el estudio en base a la comunidad autónoma dónde se encuentran. España 2006-2016. _____	145
Tabla 10. Características socio-demográficas de los pacientes (N=4.006) con cultivo positivo y datos de las pruebas de sensibilidad para la Estreptomina, la Isoniacida, la Rifampicina, el Etambutol (SIRE), y los casos multirresistentes (MDR-TB). _____	147
Tabla 11. Características clínicas de los pacientes (N=4.006) con cultivo positivo y datos de las pruebas de sensibilidad para la Estreptomina, la Isoniacida, la Rifampicina, el Etambutol (SIRE), y los casos multirresistentes (MDR-TB). _____	148
Tabla 12. Factores de riesgo asociados a la tuberculosis multirresistente (N=63). _____	149
Tabla 13. Casos con resistencia a la Isoniacida y casos MDR-TB en base a si han recibido (o no) tratamiento previo, y según el país de origen de los pacientes (N=4.006). _____	152
Tabla 14. Patrones de resistencia en los 4.006 casos con datos de las pruebas de sensibilidad para SIRE según si han recibido tratamiento previo o no. _____	154
Tabla 15. Resistencia a la Pirazinamida en los 2.925 casos con resultados de las pruebas de sensibilidad para la Isoniacida, Rifampicina, Etambutol, Estreptomina y Pirazinamida. _____	156
Tabla 16. Principales características socio-demográficas de los 74 casos con resistencia a la Pirazinamida, en función del país de procedencia (2006-2016). _____	157
Tabla 17. Principales características socio-demográficas de los 74 casos resistentes a la Pirazinamida (2006-2016) según el tipo de resistencia. _____	158
Tabla 18. Mutaciones asociadas a la resistencia detectadas por los métodos moleculares estudiados. _____	184
Tabla 19. Cebadores utilizados para la secuenciación del ADN para el gen <i>rpoB</i> y <i>rrs</i> . _____	185
Tabla 20. Evaluación de la detección de mutaciones por el Anyplex MTB/MDR/XDR en comparación al GenoType MTBDR <i>plus/sl</i> _____	186
Tabla 21. Resultados de los aislamientos (N) discrepantes obtenidos por las pruebas de sensibilidad fenotípicas, el GenoType, Anyplex y la secuenciación del ADN _____	188

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo infectivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	33
Figura 2. Porcentaje de casos de pacientes enfermos de tuberculosis con coinfección por el VIH.	40
Figura 3. Distribución de casos de tuberculosis notificados por cada 100.000 habitantes en la región europea en 2017.	41
Figura 4. Revisión de la reacción de inmunidad celular en la prueba de la Tuberculina.	51
Figura 5. Visualización, mediante microscopia, de las cuerdas formadas por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex en una tinción de Ziehl-Neelsen.	56
Figura 6. Tubos de Löwenstein-Jensen con cultivo positivo para <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex.	57
Figura 7. Métodos basados en el cultivo de medios líquidos para la realización de las pruebas de sensibilidad indirectas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex: Bactec MGIT 960 (izquierda), MB/BacT ALERT 3D (centro) y VersaTREK (derecha).	58
Figura 8. Tubo de MGIT con crecimiento positivo para <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex.	59
Figura 9. Distribución geográfica en España, por CCAA, de los 930 casos analizados (2016-2018).	117
Figura 10. Distribución geográfica en España, por CCAA, de los 122 casos de tuberculosis que presentaron resistencia a algún fármaco antituberculoso de primera línea.	121
Figura 11. Diagrama de flujo que describe el proceso de selección de los casos.	144
Figura 12. Distribución temporal de los casos estudiados durante 2006-2016, así como del inicio de la base de datos para registrar casos y del inicio de estudios que han empleado dicha base de datos.	150
Figura 13. Distribución de los 4.006 casos con tuberculosis registrados en el estudio, y su proporción (%), por comunidades y ciudades autónomas en España (2006-2016).	151
Figura 14. Porcentaje de casos con tuberculosis notificados por año, entre 2006 y 2016, en base al patrón de resistencia farmacológica.	155

ABREVIATURAS

A

ADN Ácido desoxirribonucleico

AMK Amikacina

ARN Ácido ribonucleico

ATP Adenosina trifosfato

C

CAP Capreomicina

CDC *Centers for Disease Control and Prevention*

CLSI *Clinical & Laboratory Standards Institute*

CIM Concentración inhibitoria mínima

D

DST *Drug susceptibility test*

E

EMB Etambutol

ECDC *European Centre for Disease Prevention and Control*

F

FDA *Food and Drug Administration*

FLQ Fluoroquinolonas

I

INH Isoniacida

IFN Interferón

IGRA *Interferon gamma release assay*

IL Interleucina

IS *Insertion Sequences*

K

KAN Kanamicina

L

LFX Levofloxacino

M

MDR *Multidrug-resistant*

MGIT *Mycobacteria Growth Indicator Tube*

MIRU *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit*

MNT	Micobacterias no tuberculosas
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
N	
NAA	<i>Nucleic acid amplification</i>
O	
OADC	<i>Oleic Albumin Dextrose Catalase</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
P	
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PRA	<i>PCR-restriction enzyme pattern analysis</i>
PZA	Pirazinamida
R	
RIF	Rifampicina
S	
STR	Estreptomina
SEIMC	Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica
SEPAR	Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica
T	
TB	Tuberculosis
U	
UITB	Unidad de Investigación en Tuberculosis de Barcelona
V	
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
W	
WHO	<i>World Health Organization</i>
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>
X	
XDR	<i>Extensively drug-resistant</i>

RESUMEN

La tuberculosis es la enfermedad infecciosa con mayor mortalidad provocada por un solo microorganismo (con excepción del virus SARS-CoV-2), y una de las diez principales causas de muerte en el mundo. De hecho, en el último informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que al año 10 millones de personas enferman de tuberculosis y que ocasiona 1,4 millones de fallecimientos. La aparición de aislamientos clínicos multirresistentes (MDR) y su diseminación sigue siendo uno de los mayores problemas de salud mundial, conllevando una mayor gravedad de la enfermedad, una menor tasa de curación y una prolongación del tratamiento, así como un incremento del riesgo de toxicidad y un mayor gasto sanitario. Por ello, el diagnóstico rápido de la enfermedad y de la farmacorresistencia son dos de los pilares fundamentales para el control de la tuberculosis. De este modo, se puede iniciar cuanto antes el tratamiento farmacológico y el estudio de contactos, rompiendo así la cadena de transmisión y reduciendo su impacto epidemiológico, y muy especialmente en determinados colectivos (p. ej. Inmunodeprimidos).

Tradicionalmente, el diagnóstico de la tuberculosis se ha realizado mediante métodos microbiológicos convencionales como la baciloscopia y el cultivo micobacteriano. Sin embargo, estos presentan una serie de inconvenientes. Por un lado, la observación al microscopio de la baciloscopia tiene una baja sensibilidad (45-80% de los aislamientos de tuberculosis con cultivo positivo) y, por otro lado, el cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* complex (especialmente en medio sólido) es muy lento y puede tardar hasta seis semanas en crecer.

En los últimos años se han desarrollado diversos métodos, fundamentalmente moleculares, de gran utilidad y que han supuesto un importante avance en el diagnóstico rápido de la tuberculosis, así como la detección rápida de la farmacorresistencia, con una notable sensibilidad y especificidad. La OMS, respalda y recomienda el uso de algunos de estos sistemas desde hace años, en virtud de su relación coste-beneficio y sus buenos resultados. Entre ellos, destacan los basados en la amplificación de ácidos nucleicos (PCR) del genoma micobacteriano para posteriormente hibridarlos con sondas marcadas e inmovilizadas en una membrana de nitrocelulosa, como el GenoType (Hain Lifescience, Nehren, Germany), entre otros, o bien mediante PCR a tiempo real, en las cuales se amplifica e hibrida simultáneamente

el producto de la amplificación del ADN con sondas marcadas con fluorescencia. Dentro de estas últimas, el sistema más conocido y promocionado es el sistema GeneXpert (Cepheid, Sunnyvale, USA).

En España, existe una monitorización insuficiente de la tuberculosis, no incluyendo en la declaración obligatoria la notificación de algunos datos relevantes del paciente y de laboratorio. Esta infra-notificación afecta, de forma relevante, a gran parte de los datos de sensibilidad a los fármacos contra la tuberculosis. De este modo, muchos de los datos existentes proceden de estudios puntuales más o menos representativos a nivel geográfico y/o temporal. Por ello los objetivos de esta tesis son: 1) conocer en la actualidad la resistencia a los fármacos antituberculosos en múltiples áreas geográficas de España, además de analizar los mecanismos moleculares relacionados con la misma y determinar qué factores clínico-epidemiológicos pueden estar asociados a la resistencia (Estudio REMOTUBES; 2016-2018); 2) conocer y analizar cómo ha evolucionado la resistencia a los fármacos antituberculosos en España en la última década (2006-2016), y determinar qué factores clínico-epidemiológicos pueden estar implicados en la resistencia a la tuberculosis en el país; 3) evaluar la eficacia de un sistema de PCR a tiempo real ultrasensible para la detección de *M. tuberculosis* complex y su multirresistencia; y 4) evaluar el rendimiento diagnóstico del sistema molecular Anyplex II MTB/MDR/XDR para la detección rápida de las resistencias a los fármacos antituberculosos más importantes en *M. tuberculosis* complex.

Los resultados del estudio REMOTUBES (2016-2018) basados en 930 pacientes de 22 centros hospitalarios en España, mostraron, en líneas generales, unos porcentajes de resistencia bajos a los fármacos contra la tuberculosis en nuestro país, a pesar de un ligero incremento global (13,1%) en comparación con estudios previos (9,2%). La Isoniacida fue el fármaco con un mayor número de casos resistentes, seguido por la Estreptomina y la Pirazinamida. Por otro lado, la Isoniacida presentó un porcentaje de casos con resistencia inicial (6,4%) bastante parecido a los datos publicados en trabajos anteriores (5,7%), y algo inferior en pacientes con antecedentes de tratamiento antituberculoso previo (18%), tanto en nacidos en España (10,8%) como en extranjeros (29,2%). En cuanto a la multirresistencia (MDR-TB), el porcentaje de casos con resistencia inicial (1,5%) y adquirida (13,1%) fue bastante similar al de

estudios previos en España (1,2 y 12,9%, respectivamente). El análisis de los mecanismos de resistencia mostró que, de los pacientes con tuberculosis resistente a la Isoniacida, el 55,2% de ellos presentaban mutaciones en el gen *katG*, relacionado con elevados niveles de resistencia. Por otro lado, casi un tercio (31,3%) de los pacientes que fueron resistentes a este fármaco presentaron mutaciones en el gen *inhA*, asociado con resistencia fenotípica de bajo nivel. En relación a los mecanismos de resistencia observados, estos pueden ser detectados, en una gran proporción y de forma rápida y sencilla, mediante los métodos de diagnóstico molecular disponibles en la actualidad. De esta forma, se podría llevar a cabo un diagnóstico rápido de la resistencia en tuberculosis en nuestro país, en una gran parte de los pacientes que lo requiriesen de forma específica. Así, la relación del gen *katG* con la multirresistencia, ya bien descrita, se observó claramente en este estudio, ya que el gen *katG* estaba mutado en el 71,4% de los casos MDR-TB, que está en consonancia con los trabajos anteriores en nuestro país. De modo similar sucedió con la proporción de casos multirresistentes con el gen *inhA* alterado, la cual se mantiene en niveles similares (inferiores al 20%). Por otro lado, si bien el porcentaje de casos resistentes a la Rifampicina ha sido algo más elevado (2,7%) que en estudios previos en España (1,9%), la proporción de casos resistentes a este fármaco que fue a su vez MDR-TB (84%), fue menor que en esos estudios en nuestro país (90-100%). Aun así, la Rifampicina continúa siendo un buen marcador de multirresistencia, y por ello es interesante remarcar que el 100% de las mutaciones relacionadas con la resistencia a este antimicrobiano se encontraron en el gen *rpoB*, localizándose el 76% de ellas en el codón 531, que está relacionado con altos niveles de resistencia a la Rifampicina. En lo que respecta a las fluoroquinolonas, el 66,7% de los casos resistentes presentaron mutaciones en el gen *gyrA*. En el estudio también se reveló la posible presencia de resistencias cruzadas entre los fármacos útiles en el tratamiento de la tuberculosis, a parte de las fluoroquinolonas, como por ejemplo la existente entre la Isoniacida (con el gen *inhA* mutado) y la Etionamida (56,3%), la que hay entre la Rifampicina y Rifabutina (76%), entre la Amikacina y la Estreptomicina (100%) o en menor medida entre la Capreomicina y la Amikacina/Kanamicina (33,4%). El análisis de las características socio-demográficas y clínicas mostró que los principales factores de riesgo asociados a la tuberculosis multirresistente fueron principalmente el hecho de haber recibido

tratamiento previo con fármacos antituberculosos (representando un riesgo diez veces mayor de tener MDR-TB respecto a los casos nuevos de tuberculosis), ser extranjero (riesgo seis veces mayor) y tener coinfección por el VIH (riesgo cuatro veces mayor). Respecto al tratamiento farmacológico de la tuberculosis, este fue satisfactorio en casi el 90% de los casos, lo que denota el adecuado tratamiento prescrito (fundamentalmente de cuatro fármacos iniciales) y la adherencia al mismo de los pacientes con tuberculosis en el periodo del estudio REMOTUBES. Con todo, a pesar de que los datos de resistencia a los antimicrobianos de *M. tuberculosis* complex en España no son muy elevados, diversos aspectos sociales del contexto actual, como los flujos migratorios y la infra-notificación existente de los datos de resistencia, entre otros, hacen que sea muy necesario, siguiendo las recomendaciones de la OMS, seguir realizando estudios de sensibilidad a los fármacos en tuberculosis que sean representativos en nuestro país.

En el segundo estudio (2006-2016) se analizaron 4.006 pacientes procedentes de 67 hospitales en España, y cuyos los resultados también mostraron bajos porcentajes de resistencia a algún fármaco contra la tuberculosis en España entre 2006 y 2016 (9,7%), así como bajos niveles de MDR-TB (1,6%). Se observó una tendencia creciente de casos resistentes a lo largo del periodo de estudio (8,9% en 2006 y 12,0% en 2016), similar a la de otros países europeos como Alemania, entre otros. Sin embargo, hubo años en los que la tasa de resistencia a algún fármaco antituberculoso varió considerablemente, como sucedió en 2013 (5,1%), 2014 (23,7%) y 2015 (15,1%), mientras que en otros años fueron más similares al promedio. En cuanto a los fármacos, destacaron los resultados de monorresistencia asociados a la Isoniacida y la Estreptomicina, además de los niveles de resistencia conjunta entre ambos antimicrobianos. En general, la multirresistencia se encontró en el 1,6% de los casos estudiados, pero mostró una tendencia significativamente mayor durante el periodo de estudio ($p < 0,01$): la MDR-TB representó 8/787 (1,0%) casos de tuberculosis en 2006 y 9/416 (2,2%) en 2016, con un notable incremento de casos en 2015 (9/239 casos MDR-TB que representaron el 3,8%). Estos niveles de multirresistencia se pueden considerar bajos si se comparan con los datos proporcionados por la OMS a nivel mundial (4,1%) y el EDCCD en Europa (3,8%). En referencia a los factores de riesgo

asociados con la resistencia, el hecho de ser extranjero fue de gran relevancia, especialmente en los pacientes provenientes de Pakistán, un país con elevada prevalencia de tuberculosis y de MDR-TB. Otros factores de riesgo que incrementaron la probabilidad de tener MDR-TB, además del origen del paciente, fueron tener más de 50 años, el hecho de haber recibido tratamiento previamente con fármacos antituberculosos, el tipo de convivencia o la coinfección con el VIH. Así, los datos obtenidos en este estudio sugieren que la multirresistencia, un fenómeno que surgió en la década de 1950 en respuesta a los primeros antibióticos empleados contra la tuberculosis, continúa representando un desafío en el siglo XXI. Es esencial realizar, entre otros aspectos, un diagnóstico microbiológico de la resistencia de manera más rápida y precisa, acortando así los tiempos de detección, para combatir la tuberculosis multirresistente.

En el tercer estudio se evaluó el sistema de PCR a tiempo real Xpert MTB/RIF Ultra para la detección de *M. tuberculosis* complex y la resistencia a la Rifampicina. Este sistema integrado ya se había analizado anteriormente para el diagnóstico rápido de la tuberculosis pulmonar en adultos, niños y pacientes con VIH, pero no así para la tuberculosis extrapulmonar donde las muestras tienen una baja carga bacilar, lo cual supone todo un reto a la hora de detectar material genético micobacteriano en ellas. De esta forma se estudiaron 108 muestras extrapulmonares con cultivo positivo para el complejo *M. tuberculosis*, 20 muestras que contenían micobacterias no tuberculosas y 40 muestras con cultivo micobacteriano negativo. Para este grupo de muestras, todas ellas negativas en la baciloscopia, la técnica resultó ser de gran utilidad al mostrar una sensibilidad de detección del ADN del microorganismo (y por lo tanto de la enfermedad) del 75,9%, y una especificidad del 100%. Estos resultados obtenidos fueron superiores a los de estudios previos donde se emplearon muestras similares y una versión anterior de este sistema de PCR a tiempo real. Además, los resultados fueron proporcionados de manera más rápida, y destacando la rentabilidad obtenida en los líquidos pleurales, una de las muestras menos óptimas para detectar ADN micobacteriano, y sus excelentes datos con muestras de origen ganglionar y fluidos no estériles. Si bien es cierto que esta técnica molecular es capaz de detectar resistencia a la Rifampicina (marcador de multirresistencia), en el estudio se incluyó un número

bajo de muestras con mutaciones relacionadas con la resistencia a la Rifampicina. Por ello, no se pudo valorar su utilidad en la detección precoz de resistencias a este medicamento. La principal limitación de este sistema molecular ultra sensible parece basarse en el mismo incremento de la sensibilidad, que conlleva una cierta disminución de la especificidad, tal y como afirman varios trabajos, por la presencia de ADN de *M. tuberculosis* complex o bacilos intactos. No obstante, ello no fue observado en el presente estudio. Por otro lado, la aparición de una nueva categoría semicuantitativa de resultado (“Trace”) también podría ser una limitación de la técnica, al no proporcionar información sobre la resistencia a la Rifampicina en estos casos. Sin embargo, esta situación tiene poca relevancia en áreas con baja incidencia de MDR-TB, tal y como sucede en España. En virtud de los resultados y de la rapidez de la técnica (33 minutos menos para un resultado negativo y 45 minutos menos para un resultado positivo, en comparación a su predecesora), el Servicio de Microbiología del Hospital de Bellvitge implementó el Xpert MTB/RIF Ultra como técnica de rutina en todo tipo de muestras clínicas con baciloscopia negativa o positiva para el diagnóstico de una tuberculosis pulmonar y/o extrapulmonar ante una sospecha clínica media o alta de padecer la enfermedad.

En cuanto al cuarto estudio, donde se compararon dos técnicas moleculares (Anyplex II MTB/MDR/XDR y GenoType MTBDR*plus*/MTBDR*sl*) para detectar *M. tuberculosis* complex multirresistente y con resistencia extendida en un total de 57 aislamientos clínicos (uno por paciente), ambas técnicas demostraron una notable sensibilidad en la detección de mutaciones relacionadas con la resistencia a la Isoniacida, Rifampicina y fluoroquinolonas, si bien es cierto que el GenoType presentó en algunos casos una sensibilidad ligeramente superior. Respecto a la Isoniacida, ambas técnicas lograron identificar la misma cantidad de mutaciones en el gen *katG*, y el GenoType identificó dos mutaciones más en *inhA* que el Anyplex. De modo similar sucedió con la Rifampicina, con datos notables en cuanto a la capacidad de detección de resistencias a este fármaco mediante el Anyplex (84,6%) pero inferior a la mostrada por el GenoType (100%). Esa diferencia se basó en dos aislamientos resistentes que no identificó el Anyplex y que tenían mutaciones en posiciones del gen *rpoB* que también contempla la prueba Anyplex II MTB/MDR/XDR. Esos dos aislamientos, a su vez, fueron

MDR-TB. Con relación a los datos de MDR-TB, la capacidad de detección entre ambas técnicas fue similar a la obtenida en la Rifampicina (81,8% en Anyplex y 100% en GenoType). En las fluoroquinolonas, de los 57 aislamientos analizados en el estudio, tan solo cuatro presentaron resistencia según el método fenotípico, detectando el Anyplex y el GenoType mutaciones en todas ellas (100%). Sin embargo, ya que el número de cepas resistentes a las fluoroquinolonas analizadas en este trabajo es bajo, sería necesaria una mayor cantidad de aislamientos para obtener una conclusión más sólida sobre la sensibilidad de estos sistemas moleculares para este grupo de fármacos. En lo que respecta a los aminoglucósidos y péptidos cíclicos (inyectables de segunda línea), la prueba de sensibilidad fenotípica detectó resistencia en tan solo dos aislamientos (uno a la Amikacina y uno a la Kanamicina), y la sensibilidad de ambas técnicas moleculares fue baja (50%, detectando tan solo la resistencia asociada a la Kanamicina). Tal y como sucede con las fluoroquinolonas, se debe tener en cuenta el bajo número de cepas estudiadas resistentes a este grupo de fármacos. Los resultados para la Estreptomina, Etambutol y Pirazinamida no fueron los deseados en ninguna de las dos técnicas moleculares, debido a que se contemplan pocas dianas (Estreptomina) o ninguna (Etambutol en el caso del GenoType MTBDRs/ v 2.0, y la Pirazinamida en ambos métodos). En cuanto a las características propias de cada método molecular, el Anyplex proporcionó los resultados más rápidamente que el GenoType, reduciendo el tiempo global en 4-5 horas, conllevando una menor manipulación y una menor contaminación cruzada. En suma, tanto el Anyplex como el GenoType demostraron tener una buena capacidad de detección de mutaciones relacionadas con la resistencia a la Isoniacida, Rifampicina y fluoroquinolonas en el complejo *M. tuberculosis*. Si bien el GenoType detectó alguna resistencia más, el Anyplex fue una técnica diagnóstica más rápida.

En conclusión, la resistencia a los fármacos antituberculosos en España para *M. tuberculosis* complex en los últimos 13 años y en la actualidad es baja, si se comparan estos datos con los expuestos a nivel mundial por la OMS y a nivel europeo por el EDCD. Sin embargo, se observó una tendencia ligeramente creciente de casos resistentes a lo largo del periodo de estudio (2006-2016 y 2016-2018) similar a la de otros países europeos, probablemente relacionada con diversos factores, como la

inmigración entre otros. Además, las técnicas moleculares basadas en la amplificación del ADN y posterior hibridación del producto de la PCR en fase sólida (PCR-hibridación reversa), y aquellas basadas en la amplificación e hibridación simultánea del ADN con sondas marcadas con fluorescencia (PCR a tiempo real) han demostrado ser unas herramientas útiles para la identificación de micobacterias tuberculosas y para el diagnóstico rápido presuntivo de la MDR-TB y XDR-TB que, no obstante, requiere una confirmación mediante pruebas de sensibilidad fenotípicas.

La tuberculosi és la malaltia infecciosa amb major mortalitat provocada per un sol microorganisme (amb excepció del virus SARS-CoV-2), i una de les deu principals causes de mort en el món. De fet, en l'últim informe de l'Organització Mundial de la Salut (OMS), s'estima que 10 milions de persones emmalalteixen de tuberculosi a l'any i que ocasiona 1,4 milions de defuncions. L'aparició d'aïllaments clínics multiresistents (MDR) i la seva disseminació continua sent un dels majors problemes de salut mundial, comportant una major gravetat de la malaltia, una menor taxa de curació i una prolongació del tractament, així com un increment del risc de toxicitat i una major despesa sanitària. Per això, el diagnòstic ràpid de la malaltia i de la farmacoresistència són dos dels pilars fonamentals per al control de la tuberculosi. D'aquesta manera, es pot iniciar com més aviat millor el tractament farmacològic i l'estudi de contactes, trencant així la cadena de transmissió i reduint el seu impacte epidemiològic, i molt especialment en determinats col·lectius (p. ex. Immunodeprimits).

Tradicionalment, el diagnòstic de la tuberculosi s'ha realitzat mitjançant mètodes microbiològics convencionals com la bacil·loscòpia i el cultiu micobacterià. No obstant això, aquests presenten una sèrie d'inconvenients. D'una banda, l'observació al microscopi de la bacil·loscòpia té una baixa sensibilitat (45-80% dels aïllaments de tuberculosi amb cultiu positiu) i, d'altra banda, el cultiu de *Mycobacterium tuberculosis* complex (especialment al mig sòlid) és molt lent i pot trigar fins a sis setmanes a créixer.

En els últims anys s'han desenvolupat diversos mètodes, fonamentalment moleculars, de gran utilitat i que han suposat un important avanç en el diagnòstic ràpid de la tuberculosi, així com la detecció ràpida de la farmacoresistència, amb una notable sensibilitat i especificitat. L'OMS, dona suport a i recomana l'ús d'alguns d'aquests sistemes des de fa anys, en virtut de la seva relació cost-benefici i els seus bons resultats. Entre ells, destaquen els basats en l'amplificació d'àcids nucleics (PCR) del genoma micobacterià per a posteriorment hibridar-los amb sondes marcades i immobilitzades en una membrana de nitrocel·lulosa, com el GenoType (Hain Lifescience, Nehren, Germany), entre altres, o bé mitjançant PCR a temps real, en les quals s'amplifica i hibrida simultàniament el producte de l'amplificació de l'ADN amb sondes marcades amb fluorescència. Dins d'aquestes

últimes, el sistema més conegut i promocionat és el sistema GeneXpert (Cepheid, Sunnyvale, USA).

A Espanya, existeix un monitoratge insuficient de la tuberculosi, no incloent en la declaració obligatòria la notificació d'algunes dades rellevants del pacient i de laboratori. Aquesta infra-notificació afecta, de manera rellevant, a gran part de les dades de sensibilitat als fàrmacs contra la tuberculosi. D'aquesta manera, moltes de les dades existents procedeixen d'estudis puntuals més o menys representatius en l'àmbit geogràfic i/o temporal. Per això els objectius d'aquesta tesi són: 1) conèixer en l'actualitat la resistència als fàrmacs antituberculosos en múltiples àrees geogràfiques d'Espanya, a més d'analitzar els mecanismes moleculars relacionats amb la mateixa i determinar quins factors clínic-epidemiològics poden estar associats a la resistència (Estudi REMOTUBES; 2016-2018); 2) conèixer i analitzar com ha evolucionat la resistència als fàrmacs antituberculosos a Espanya en l'última dècada (2006-2016), i determinar quins factors clínic-epidemiològics poden estar implicats en la resistència a la tuberculosi al país; 3) avaluar l'eficàcia d'un sistema de PCR a temps real ultrasensible per a la detecció de *M. tuberculosis* complex i la seva multiresistència; i 4) avaluar el rendiment diagnòstic del sistema molecular Anyplex II MTB/MDR/XDR per a la detecció ràpida de les resistències als fàrmacs antituberculosos més importants en *M. tuberculosis* complex.

Els resultats de l'estudi REMOTUBES (2016-2018) basats en 930 pacients de 22 centres hospitalaris a Espanya, van mostrar, en línies generals, uns percentatges de resistència baixos als fàrmacs contra la tuberculosi al nostre país, malgrat un lleuger increment global (13,1%) en comparació amb estudis previs (9,2%). La Isoniazida va ser el fàrmac amb un major nombre de casos resistents, seguit per l'Estreptomocina i la Pirazinamida. D'altra banda, la Isoniazida va presentar un percentatge de casos amb resistència inicial (6,4%) bastant semblant a les dades publicades en treballs anteriors (5,7%), i una mica inferior en pacients amb antecedents de tractament antituberculós previ (18%), tant en nascuts a Espanya (10,8%) com en estrangers (29,2%). Quant a la multiresistència (MDR-TB), el percentatge de casos amb resistència inicial (1,5%) i adquirida (13,1%) va ser bastant similar al d'estudis previs a Espanya (1,2 i 12,9%, respectivament). L'anàlisi dels mecanismes de resistència va mostrar que, dels pacients amb tuberculosi resistent a la Isoniazida, el 55,2% d'ells presentaven mutacions en el

gen *katG*, relacionat amb elevats nivells de resistència. D'altra banda, gairebé un terç (31,3%) dels pacients que van ser resistents a aquest fàrmac van presentar mutacions en el gen *inhA*, associat amb resistència fenotípica de baix nivell. En relació amb els mecanismes de resistència observats, aquests poden ser detectats, en una gran proporció i de manera ràpida i senzilla, mitjançant els mètodes de diagnòstic molecular disponibles en l'actualitat. D'aquesta manera, es podria dur a terme un diagnòstic ràpid de la resistència en tuberculosi al nostre país, en una gran part dels pacients que el requerissin de manera específica. Així, la relació del gen *katG* amb la multiresistència, ja ben descrita, es va observar clarament en aquest estudi, ja que el gen *katG* estava mutat en el 71,4% dels casos MDR-TB, que està d'acord amb els treballs anteriors al nostre país. De manera similar va succeir amb la proporció de casos multiresistents amb el gen *inhA* alterat, la qual es manté en nivells similars (inferiors al 20%). D'altra banda, si bé el percentatge de casos resistents a la Rifampicina ha estat una mica més elevat (2,7%) que en estudis previs a Espanya (1,9%), la proporció de casos resistents a aquest fàrmac que va ser al seu torn MDR-TB (84%), va ser menor que en aquests estudis al nostre país (90-100%). Així i tot, la Rifampicina continua sent un bon marcador de multiresistència, i per això és interessant remarcar que el 100% de les mutacions relacionades amb la resistència a aquest antimicrobià es van trobar en el gen *rpoB*, localitzant-se el 76% d'elles en el codó 531, que està relacionat amb alts nivells de resistència a la Rifampicina. Pel que fa a les fluoroquinolones, el 66,7% dels casos resistents van presentar mutacions en el gen *gyrA*. En l'estudi també es va revelar la possible presència de resistències creuades entre els fàrmacs útils en el tractament de la tuberculosi, a part de les fluoroquinolones, com per exemple l'existent entre la Isoniazida (amb el gen *inhA* mutat) i l'Etionamida (56,3%), la que hi ha entre la Rifampicina i Rifabutina (76%), entre l'Amikacina i l'Estreptomicina (100%) o en menor mesura entre la Capreomicina i la Amikacina/Kanamicina (33,4%). L'anàlisi de les característiques sociodemogràfiques i clíniques va mostrar que els principals factors de risc associats a la tuberculosi multiresistent van ser principalment el fet d'haver rebut tractament previ amb fàrmacs antituberculosos (representant un risc deu vegades major de tenir MDR-TB respecte als casos nous de tuberculosi), ser estranger (risc sis vegades major) i tenir coinfecció pel VIH (risc quatre vegades major). Respecte al

tractament farmacològic de la tuberculosi, aquest va ser satisfactori en gairebé el 90% dels casos, la qual cosa denota l'adequat tractament prescrit (fonamentalment de quatre fàrmacs inicials) i l'adherència al mateix dels pacients amb tuberculosi en el període de l'estudi REMOTUBES. Amb tot, a pesar que les dades de resistència als antimicrobians de *M. tuberculosis* complex a Espanya no són molt elevats, diversos aspectes socials del context actual, com els fluxos migratoris i la infra-notificació existent de les dades de resistència, entre altres, fan que sigui molt necessari, seguint les recomanacions de l'OMS, continuar realitzant estudis de sensibilitat als fàrmacs en tuberculosi que siguin representatius al nostre país.

En el segon estudi (2006-2016) es van analitzar 4.006 pacients procedents de 67 hospitals a Espanya, i que els seus resultats també van mostrar baixos percentatges de resistència a algun fàrmac contra la tuberculosi a Espanya entre 2006 i 2016 (9,7%), així com baixos nivells de MDR-TB (1,6%). Es va observar una tendència creixent de casos resistents al llarg del període d'estudi (8,9% en 2006 i 12,0% en 2016), similar a la d'altres països europeus com Alemanya, entre altres. No obstant això, va haver-hi anys en què la taxa de resistència a algun fàrmac antituberculós va variar considerablement, com va succeir en 2013 (5,1%), 2014 (23,7%) i 2015 (15,1%), mentre que en altres anys van ser més similars a la mitjana. Quant als fàrmacs, van destacar els resultats de monorresistència associats a la Isoniazida i l'Estreptomicina, a més dels nivells de resistència conjunta entre tots dos antimicrobians. En general, la multiresistència es va trobar en l'1,6% dels casos estudiats, però va mostrar una tendència significativament major durant el període d'estudi ($p < 0,01$): la MDR-TB va representar 8/787 (1,0%) casos de tuberculosi en 2006 i 9/416 (2,2%) en 2016, amb un notable increment de casos en 2015 (9/239 casos MDR-TB que van representar el 3,8%). Aquests nivells de multiresistència es poden considerar baixos si es comparen amb les dades proporcionades per l'OMS en l'àmbit mundial (4,1%) i el EDCD a Europa (3,8%). En referència als factors de risc associats amb la resistència, el fet de ser estranger va ser de gran rellevància, especialment en els pacients provinents del Pakistan, un país amb elevada prevalença de tuberculosi i de MDR-TB. Altres factors de risc que van incrementar la probabilitat de tenir MDR-TB, a més de l'origen del pacient, van ser tenir més de 50 anys, el fet d'haver rebut tractament prèviament amb fàrmacs antituberculosos, el tipus de convivència o la coinfecció amb el VIH. Així, les dades

obtingudes en aquest estudi suggereixen que la multiresistència, un fenomen que va sorgir en la dècada de 1950 en resposta als primers antibiòtics emprats contra la tuberculosi, continua representant un desafiament en el segle XXI. És essencial realitzar, entre altres aspectes, un diagnòstic microbiològic de la resistència de manera més ràpida i precisa, escurçant així els temps de detecció, per a combatre la tuberculosi multiresistent.

En el tercer estudi es va avaluar el sistema de PCR a temps real Xpert MTB/RIF Ultra per a la detecció de *M. tuberculosis* complex i la resistència a la Rifampicina. Aquest sistema integrat ja s'havia analitzat anteriorment per al diagnòstic ràpid de la tuberculosi pulmonar en adults, nens i pacients amb VIH, però no així per a la tuberculosi extrapulmonar on les mostres tenen una baixa càrrega bacil·lar, la qual cosa suposa tot un repte a l'hora de detectar-hi material genètic micobacterià. D'aquesta manera es van estudiar 108 mostres extrapulmonares amb cultiu positiu per al complex *M. tuberculosis*, 20 mostres que contenien micobacteris no tuberculosos i 40 mostres amb cultiu micobacterià negatiu. Per a aquest grup de mostres, totes elles negatives en la bacil·loscòpia, la tècnica va resultar ser de gran utilitat en mostrar una sensibilitat de detecció de l'ADN del microorganisme (i per tant de la malaltia) del 75,9%, i una especificitat del 100%. Aquests resultats obtinguts van ser superiors als d'estudis previs on es van emprar mostres similars i una versió anterior d'aquest sistema de PCR a temps real. A més, els resultats van ser proporcionats de manera més ràpida, i destacant la rendibilitat obtinguda en els líquids pleurals, una de les mostres menys òptimes per a detectar ADN micobacterià, i les seves excel·lents dades amb mostres d'origen ganglionar i fluids no estèrils. Si bé és cert que aquesta tècnica molecular és capaç de detectar resistència a la Rifampicina (marcador de multiresistència), en l'estudi es va incloure un nombre baix de mostres amb mutacions relacionades amb la resistència a la Rifampicina. Per això, no es va poder valorar la seva utilitat en la detecció precoç de resistències a aquest medicament. La principal limitació d'aquest sistema molecular ultrasensible sembla basar-se en el mateix increment de la sensibilitat, que comporta una certa disminució de l'especificitat, tal com afirmen diversos treballs, per la presència d'ADN de *M. tuberculosis* complex o bacils intactes. Tanmateix, això no va ser observat en el present estudi. D'altra banda,

l'aparició d'una nova categoria semiquantitativa de resultat ("Trace") també podria ser una limitació de la tècnica, al no proporcionar informació sobre la resistència a la Rifampicina en aquests casos. No obstant això, aquesta situació té poca rellevància en àrees amb baixa incidència de MDR-TB, tal com succeeix a Espanya. En virtut dels resultats i de la rapidesa de la tècnica (33 minuts menys per a un resultat negatiu i 45 minuts menys per a un resultat positiu, en comparació a la seva predecessora), el Servei de Microbiologia de l'Hospital de Bellvitge va implementar el Xpert MTB/RIF Ultra com a tècnica de rutina en tota mena de mostres clíniques amb bacil·loscòpia negativa o positiva per al diagnòstic d'una tuberculosi pulmonar i/o extrapulmonar davant una sospita clínica mitjana o alta de patir la malaltia.

Pel que fa al quart estudi, on es van comparar dues tècniques moleculars (Anyplex II MTB/MDR/XDR i GenoType MTBDR*plus*/MTBDR*sl*) per a detectar *M. tuberculosis* complex multiresistent i amb resistència estesa en un total de 57 aïllaments clínics (un per pacient), totes dues tècniques van demostrar una notable sensibilitat en la detecció de mutacions relacionades amb la resistència a la Isoniazida, Rifampicina i fluoroquinolones, si bé és cert que el GenoType va presentar en alguns casos una sensibilitat lleugerament superior. Respecte a la Isoniazida, totes dues tècniques van aconseguir identificar la mateixa quantitat de mutacions en el gen *katG*, i el GenoType va identificar dues mutacions més en *inhA* que l'Anyplex. De manera similar va succeir amb la Rifampicina, amb dades notables quant a la capacitat de detecció de resistències a aquest fàrmac mitjançant l'Anyplex (84,6%) però inferior a la mostrada pel GenoType (100%). Aquesta diferència es va basar en dos aïllaments resistents que no va identificar l'Anyplex i que tenien mutacions en posicions del gen *rpoB* que també contempla la prova Anyplex II MTB/MDR/XDR. Aquests dos aïllaments, al seu torn, van ser MDR-TB. En relació amb les dades de MDR-TB, la capacitat de detecció entre totes dues tècniques va ser similar a l'obtinguda en la Rifampicina (81,8% en Anyplex i 100% en GenoType). En les fluoroquinolones, dels 57 aïllaments analitzats en l'estudi, tan sols quatre van presentar resistència segons el mètode fenotípic, detectant l'Anyplex i el GenoType mutacions en totes elles (100%). No obstant això, ja que el nombre de ceps resistents a les fluoroquinolones analitzades en aquest treball és baix, seria necessària una major quantitat d'aïllaments per a

obtenir una conclusió més sòlida sobre la sensibilitat d'aquests sistemes moleculars per a aquest grup de fàrmacs. Pel que fa als aminoglucòsids i pèptids cíclics (injectables de segona línia), la prova de sensibilitat fenotípica va detectar resistència en tan sols dos aïllaments (un a l'Amikacina i un a la Kanamicina), i la sensibilitat de totes dues tècniques moleculars va ser baixa (50%, detectant tan sols la resistència associada a la Kanamicina). Tal com succeeix amb les fluoroquinolones, s'ha de tenir en compte el baix nombre de ceps estudiats resistents a aquest grup de fàrmacs. Els resultats per a l'Estreptomicina, Etambutol i Pirazinamida no van ser els desitjats en cap de les dues tècniques moleculars, pel fet que es contemplen poques dianes (Estreptomicina) o cap (Etambutol en el cas del GenoType MTBDRs/v 2.0, i la Pirazinamida en tots dos mètodes). Quant a les característiques pròpies de cada mètode molecular, l'Anyplex va proporcionar els resultats més ràpidament que el GenoType, reduint el temps global en 4-5 hores, comportant una menor manipulació i una menor contaminació creuada. En suma, tant l'Anyplex com el GenoType van demostrar tenir una bona capacitat de detecció de mutacions relacionades amb la resistència a la Isoniazida, Rifampicina i fluoroquinolones en el complex *M. tuberculosis*. Si bé el GenoType va detectar alguna resistència més, l'Anyplex va ser una tècnica diagnòstica més ràpida.

En conclusió, la resistència als fàrmacs antituberculosos a Espanya per a *M. tuberculosis* complex en els últims 13 anys i en l'actualitat és baixa, si es comparen aquestes dades amb els exposats a escala mundial per l'OMS i en l'àmbit europeu pel EDCD. No obstant això, es va observar una tendència lleugerament creixent de casos resistents al llarg del període d'estudi (2006-2016 i 2016-2018) similar a la d'altres països europeus, probablement relacionada amb diversos factors, com la immigració entre altres. A més, les tècniques moleculars basades en l'amplificació de l'ADN i posterior hibridació del producte de la PCR en fase sòlida (PCR-hibridació reversa), i aquelles basades en l'amplificació i hibridació simultània de l'ADN amb sondes marcades amb fluorescència (PCR a temps real) han demostrat ser unes eines útils per a la identificació de micobacteris tuberculosos i per al diagnòstic ràpid presumptiu de la MDR-TB i XDR-TB que, no obstant això, requereix una confirmació mitjançant proves de sensibilitat fenotípiques.

Tuberculosis is the deadliest infectious disease caused by a single microorganism (with the exception of the SARS-CoV-2 virus), and one of the world's top five causes of death. In fact, in the latest World Health Organization (WHO) report, it is estimated that 10 million people die from tuberculosis each year and that it causes 1.4 million deaths. The emergence of multidrug-resistant (MDR) clinical isolates and their spread continues to be one of the major global health problems, leading to a greater severity of the disease, a lower cure rate and prolonged treatment, as well as an increased risk of toxicity and higher health care costs. Therefore, rapid diagnosis of the disease and drug resistance are two of the fundamental pillars for the control of tuberculosis. In this way, drug treatment and contact investigation can be initiated as soon as possible, thus breaking the chain of transmission and reducing its epidemiological impact, especially in certain groups (e.g. immunocompromised patients).

Traditionally, the diagnosis of tuberculosis has been made using conventional microbiological methods such as bacilloscopy and mycobacterial culture. However, these have a number of drawbacks. On the one hand, microscopic observation of the smear microscopy has a low sensitivity (45-80% of tuberculosis isolates with positive culture) and, on the other hand, the culture of *Mycobacterium tuberculosis* complex (especially in the solid medium) is very slow and can take up to six weeks to grow.

In recent years, several methods have been developed, mainly molecular, which have been very useful and have represented an important advance in the rapid diagnosis of tuberculosis, as well as the rapid detection of drug resistance, with a remarkable sensitivity and specificity. The WHO has been supporting and recommending the use of some of these systems for years, due to their cost-effectiveness and good results. Among them, those based on nucleic acid amplification (PCR) of the mycobacterial genome for subsequent hybridization with labeled probes immobilized on a nitrocellulose membrane stand out, such as the GenoType (Hain Lifescience, Nehren, Germany), among others, or by real-time PCR, in which the product of DNA amplification is simultaneously amplified and hybridized with fluorescently labeled probes. Among the latter, the most well-known and promoted system is the GeneXpert system (Cepheid, Sunnyvale, USA).

In Spain, there is insufficient monitoring of tuberculosis, as some relevant patient and laboratory data are not included in the obligatory declaration. This under-reporting affects, in a relevant way, a large part of the data on sensitivity to anti-TB drugs. Thus, many of the existing data come from more or less geographically and/or temporally representative studies. Therefore, the objectives of this thesis are: 1) to currently know the resistance to antituberculosis drugs in multiple geographical areas of Spain, as well as to analyze the molecular mechanisms related to it and to determine which clinical-epidemiological factors may be associated with resistance (REMOTUBES study; 2016-2018); 2) to know and analyze how antituberculosis drug resistance has evolved in Spain in the last decade (2006-2016), and to determine which clinical-epidemiological factors may be involved in tuberculosis resistance in the country; 3) to evaluate the efficacy of an ultrasensitive real-time PCR system for the detection of *M. tuberculosis* complex and its multidrug resistance; and 4) to evaluate the diagnostic performance of the Anyplex II MTB/MDR/XDR molecular system for rapid detection of resistance to the most important antituberculosis drugs in *M. tuberculosis* complex.

The results of the REMOTUBES study (2016-2018) based on 930 patients from 22 hospital centers in Spain showed, in general terms, low percentages of resistance to anti-TB drugs in our country, despite a slight overall increase (13.1%) compared to previous studies (9.2%). Isoniazid was the drug with the highest number of resistant cases, followed by Streptomycin and Pyrazinamide. On the other hand, the percentage of cases with initial resistance to isoniazid (6.4%) was quite similar to the data published in previous studies (5.7%), and somewhat lower in patients with a history of previous antituberculosis treatment (18%), both in patients born in Spain (10.8%) and in foreigners (29.2%). Regarding multidrug-resistance (MDR-TB), the percentage of cases with initial (1.5%) and acquired (13.1%) resistance was quite similar to that of previous studies in Spain (1.2% and 12.9%, respectively). The analysis of the mechanisms of resistance showed that, of the patients with isoniazid-resistant tuberculosis, 55.2% of them had mutations in the *katG* gene, which is related to high levels of resistance. On the other hand, almost one third (31.3%) of the patients who were resistant to this drug presented mutations in the *inhA* gene, associated with low-

ABSTRACT

level phenotypic resistance. Regarding the resistance mechanisms observed, these can be detected, in a large proportion and in a rapid and simple manner, by means of currently available molecular diagnostic methods. In this way, a rapid diagnosis of resistance in tuberculosis could be carried out in our country, in a large proportion of the patients who specifically require it. Thus, the relationship of the *katG* gene with multidrug resistance, already well described, was clearly observed in this study, since the *katG* gene was mutated in 71.4% of MDR-TB cases, which is in line with previous work in our country. Similarly, the proportion of multidrug-resistant cases with the *inhA* gene altered remained at similar levels (below 20%). On the other hand, although the percentage of cases resistant to Rifampicin was somewhat higher (2.7%) than in previous studies in Spain (1.9%), the proportion of cases resistant to this drug which was in turn MDR-TB (84%), was lower than in those studies in our country (90-100%). Even so, Rifampicin continues to be a good marker of multidrug resistance, and it is therefore interesting to note that 100% of the mutations related to resistance to this antimicrobial were found in the *rpoB* gene, 76% of them being located at codon 531, which is related to high levels of resistance to Rifampicin. Regarding fluoroquinolones, 66.7% of the resistant cases had mutations in the *gyrA* gene. The study also revealed the possible presence of cross-resistance among drugs useful in the treatment of tuberculosis, apart from fluoroquinolones, for example between Isoniazid (with mutated *inhA* gene) and Ethionamide (56.3%), between Rifampicin and Rifabutin (76%), between Amikacin and Streptomycin (100%) or, to a lesser extent, between Capreomycin and Amikacin/Kanamycin (33.4%). The analysis of socio-demographic and clinical characteristics showed that the main risk factors associated with MDR-TB were mainly having received previous treatment with antituberculosis drugs (representing a tenfold increased risk of having MDR-TB with respect to new cases of tuberculosis), being a foreigner (sixfold increased risk) and having HIV co-infection (fourfold increased risk). The pharmacological treatment of tuberculosis was satisfactory in almost 90% of the cases, which indicates the adequate prescribed treatment (mainly four initial drugs) and adherence to it by patients with tuberculosis during the REMOTUBES study period. Despite the fact that the data on antimicrobial resistance of *M. tuberculosis* complex in Spain are not very high, various social aspects of the current context, such as migratory flows and the existing under-reporting of resistance

data, among others, make it very necessary, following WHO recommendations, to continue carrying out drug sensitivity studies in tuberculosis that are representative in our country.

In the second study (2006-2016), 4,006 patients from 67 hospitals in Spain were analyzed, and whose results also showed low percentages of resistance to any anti-TB drug in Spain between 2006 and 2016 (9.7%), as well as low levels of MDR-TB (1.6%). An increasing trend of resistant cases was observed throughout the study period (8.9% in 2006 and 12.0% in 2016), similar to other European countries such as Germany, among others. However, there were years in which the rate of resistance to some antituberculosis drug varied considerably, as was the case in 2013 (5.1%), 2014 (23.7%) and 2015 (15.1%), while in other years they were more similar to the average. In terms of drugs, the results of monoresistance associated with Isoniazid and Streptomycin stood out, in addition to the levels of joint resistance between both antimicrobials. Overall, multidrug resistance was found in 1.6% of the cases studied, but showed a significantly higher trend during the study period ($p < 0.01$): MDR-TB accounted for 8/787 (1.0%) tuberculosis cases in 2006 and 9/416 (2.2%) in 2016, with a notable increase in cases in 2015 (9/239 MDR-TB cases accounting for 3.8%). These levels of MDR-TB can be considered low when compared to data provided by WHO globally (4.1%) and EDCD in Europe (3.8%). In reference to risk factors associated with resistance, being a foreigner was of great relevance, especially in patients coming from Pakistan, a country with high prevalence of tuberculosis and MDR-TB. Other risk factors that increased the probability of having MDR-TB, in addition to the patient's origin, were being over 50 years of age, having previously received treatment with antituberculosis drugs, the type of cohabitation or co-infection with HIV. Thus, the data obtained in this study suggest that multidrug resistance, a phenomenon that emerged in the 1950s in response to the first antibiotics used against tuberculosis, continues to represent a challenge in the 21st century. Among other things, more rapid and accurate microbiological diagnosis of resistance, thus shortening detection times, is essential to combat multidrug-resistant tuberculosis.

The third study evaluated the Xpert MTB/RIF Ultra real-time PCR system for the detection of *M. tuberculosis* complex and Rifampicin resistance. This integrated system

ABSTRACT

has been previously tested for the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis in adults, children and HIV patients, but not for extrapulmonary tuberculosis where samples have a low bacillary load, which is a challenge when it comes to detecting mycobacterial genetic material. Thus, 108 extrapulmonary samples with positive culture for *M. tuberculosis* complex, 20 samples containing nontuberculous mycobacteria and 40 samples with negative mycobacterial culture were studied. For this group of samples, all of which were negative in the smear microscopy, the technique proved to be very useful in showing a sensitivity of detection of the DNA of the microorganism (and therefore of the disease) of 75.9%, and a specificity of 100%. These results were superior to previous studies using similar samples and a previous version of this real-time PCR system. Moreover, the results were provided in a faster way, and the performance obtained in pleural fluids, one of the less optimal samples for detecting mycobacterial DNA, and its excellent data with samples of lymph node origin and non-sterile fluids, was outstanding. While it is true that this molecular technique is capable of detecting resistance to Rifampicin (multiresistance marker), the study included a low number of samples with mutations related to Rifampicin resistance. Therefore, its usefulness in the early detection of resistance to this drug could not be assessed. The main limitation of this ultra-sensitive molecular system seems to be based on the same increase in sensitivity, which entails a certain decrease in specificity, as stated in several studies, due to the presence of complex *M. tuberculosis* DNA or intact bacilli. However, this was not observed in the present study. On the other hand, the appearance of a new semiquantitative category of result ("*Trace*") could also be a limitation of the technique, as it does not provide information on resistance to Rifampicin in these cases. However, this situation is of little relevance in areas with a low incidence of MDR-TB, as is the case in Spain. By virtue of the results and the rapidity of the technique (33 minutes less for a negative result and 45 minutes less for a positive result, compared to its predecessor), the Microbiology Department of the Hospital de Bellvitge implemented the Xpert MTB/RIF Ultra as a routine technique for all clinical specimens with negative or positive smear tests for the diagnosis of pulmonary and/or extrapulmonary tuberculosis in the presence of a medium or high clinical suspicion of having the disease.

In the fourth study, where two molecular techniques (Anyplex II MTB/MDR/XDR and GenoType MTBDR_{plus}/MTBDRs/) were compared to detect multidrug-resistant and extensively resistant *M. tuberculosis* complex in a total of 57 clinical isolates (one per patient), both techniques showed remarkable sensitivity in the detection of mutations related to resistance to isoniazid, rifampicin and fluoroquinolones, although it is true that GenoType showed slightly higher sensitivity in some cases. With respect to Isoniazid, both techniques were able to identify the same number of mutations in the *katG* gene, and the GenoType identified two more mutations in *inhA* than Anyplex. Similarly, for Rifampicin, with remarkable data in terms of the ability to detect resistance to this drug by Anyplex (84.6%) but lower than that shown by GenoType (100%). This difference was based on two resistant isolates that were not identified by Anyplex and which had mutations at positions in the *rpoB* gene also covered by the Anyplex II MTB/MDR/XDR test. These two isolates, in turn, were MDR-TB. Regarding the MDR-TB data, the detection capacity between both techniques was similar to that obtained for Rifampicin (81.8% in Anyplex and 100% in GenoType). In fluoroquinolones, of the 57 isolates analyzed in the study, only four showed resistance according to the phenotypic method, with Anyplex and GenoType detecting mutations in all of them (100%). However, since the number of strains resistant to the fluoroquinolones analyzed in this work is low, a larger number of isolates would be necessary to obtain a more solid conclusion on the sensitivity of these molecular systems for this group of drugs. Regarding aminoglycosides and cyclic peptides (second-line injectables), phenotypic sensitivity testing detected resistance in only two isolates (one to Amikacin and one to Kanamycin), and the sensitivity of both molecular techniques was low (50%, detecting only Kanamycin-associated resistance). As with the fluoroquinolones, the low number of strains studied resistant to this group of drugs should be considered. The results for Streptomycin, Ethambutol and Pyrazinamide were not the desired ones in any of the two molecular techniques, due to the fact that few targets (Streptomycin) or none (Ethambutol in the case of GenoType MTBDRs/ v 2.0, and Pyrazinamide in both methods) are contemplated. In terms of the specific characteristics of each molecular method, the Anyplex provided results more quickly than the GenoType, reducing the overall time by 4-5 hours, leading to less handling and less cross-contamination. In sum, both Anyplex and

ABSTRACT

GenoType demonstrated good ability to detect mutations related to Isoniazid, Rifampicin and fluoroquinolone resistance in *M. tuberculosis* complex. Although GenoType detected some more resistance, Anyplex was a faster diagnostic technique.

In conclusion, antituberculosis drug resistance in Spain for *M. tuberculosis* complex in the last 13 years and at present is low, if these data are compared with those reported worldwide by WHO and at European level by EDCD. However, a slightly increasing trend of resistant cases was observed throughout the study period (2006-2016 and 2016-2018) similar to that of other European countries, probably related to various factors, such as immigration among others. In addition, molecular techniques based on DNA amplification and subsequent hybridization of the solid-phase PCR product (PCR-reverse hybridization), and those based on simultaneous amplification and hybridization of DNA with fluorescently labeled probes (real-time PCR) have proven to be useful tools for the identification of tuberculous mycobacteria and for rapid presumptive diagnosis of MDR-TB and XDR-TB that, however, require confirmation by phenotypic sensitivity testing.

INTRODUCCIÓN

1. ETIOLOGIA

1.1. Género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium*, nombre propuesto por Lehmann y Neumann en 1896 [Collins 1985], es el único género dentro de la familia *Mycobacteriaceae*, perteneciente a la orden de los *Actinomycetales*. Hasta la fecha se han descrito 207 especies (<http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>) dentro de este género, un número que se ha ido incrementando recientemente debido, sobre todo, a la aparición de nuevas técnicas moleculares de identificación. Una gran parte de las especies micobacterianas son ambientales y no patógenas, aunque algunas pueden llegar a ser oportunistas. Tan solo se consideran especies patógenas estrictas al complejo *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*.

Las micobacterias son microorganismos aerobios, con un tamaño de 0,2-0,6 µm por 1-10 µm, inmóviles, sin esporas ni flagelos, que no disponen de cápsula y con una morfología colonial que varía según la especie, pudiendo ser lisa, cremosa, o incluso rugosa. Tienen un elevado contenido de G+C (entre el 60 y el 70%) en su genoma y, además, algunas especies forman colonias pigmentadas (amarillentas o anaranjadas) en presencia de luz (fotocromógenas) o en la oscuridad (escotocromógenas) [Pfyffer 2015]. La composición de su pared celular les confiere ácido-alcohol resistencia, pudiendo ser capaces de resistir la acción decolorante de un ácido y de un alcohol previamente a la exposición de un colorante (arilmetano), debido a su alto contenido de lípidos. Aunque a las micobacterias se les considera bacilos gram positivos, es muy difícil observarlos mediante la tinción de gram. En consecuencia, es más recomendable el uso tinciones que reflejen esta propiedad de ácido-alcohol resistencia, como la tinción de Ziehl-Neelsen. Esta pared celular tan particular de las micobacterias, consta de cuatro capas separadas de la membrana por el espacio periplásmico. La capa más interna está formada por glucopéptidos junto con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido-N-glucolilmurámico con cadenas cortas de Alanina, confiriendo rigidez a la bacteria. Las otras tres capas más externas están formadas por: a) polímeros de arabinosa y galactosa; b) ácidos micólicos; y c) lípidos como la trehalosa 6,6'dimicolato ("*cord factor*") y glicolípidos, que conjuntamente le otorgan propiedades hidrófobas.

1.1.1. *Mycobacterium tuberculosis* complex

El 24 de marzo de 1882, el doctor Robert Koch anunció el descubrimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, la principal especie causante de tuberculosis en humanos, y perteneciente al conjunto de bacterias ácido-alcohol resistentes conocidas como *Mycobacterium tuberculosis* complex. Durante esa época, la tuberculosis era la causa de mortalidad más habitual en Europa y América del Norte, alcanzando el 20-25% de adultos fallecidos por este bacilo [Stead 2001]. A pesar de que, con el paso de los años la incidencia ha disminuido, hoy en día la tuberculosis sigue siendo la principal causa de muerte por un solo agente infeccioso [WHO Tuberculosis Report 2020].

Este complejo micobacteriano lo conforman las siguientes especies: 1) *M. tuberculosis*; 2) *Mycobacterium bovis*, *M. bovis* BCG (Bacilo Calmette-Guérin) y *Mycobacterium caprae*, causantes de tuberculosis en el ganado y también en el ser humano; 3) *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium canetti*, causantes poco frecuentes de tuberculosis en África; 4) *Mycobacterium microti* y *Mycobacterium pinnipedii*, que pueden causar tuberculosis en roedores y focas, respectivamente, y; 5) *Mycobacterium mungi* y *Mycobacterium orygis*, las más recientemente descritas, causante de tuberculosis en mangostas (herpéstidos) y antílopes, respectivamente.

A través del microscópico se pueden observar los bacilos de manera aislada o incluso en agrupaciones de bacilos conformando una estructura de “cuerdas”, cuando estos crecen, fundamentalmente, en un medio de cultivo líquido. Estas estructuras características son debidas a la presencia de la trehalosa 6,6'-dimicolato (“*cord factor*”) en la capa superficial de la pared celular de *M. tuberculosis* complex y que se ha asociado a la patogenicidad del bacilo. Aunque las micobacterias son aerobias, en determinadas circunstancias pueden comportarse como microaerofílicas y usar lípidos como fuente de carbono [Neyrolles 2006]. Necesitan CO₂ para un mejor crecimiento y una temperatura de incubación de 35-37°C. Pese a ello, crecen de manera lenta, teniendo un tiempo de generación de 12 a 24 h, posiblemente debido a que solo dispone de un operón para la síntesis de ARN [Cole 1998].

Las micobacterias, son considerados microorganismos resistentes a la desecación y a la desinfección con productos químicos en comparación a otros microorganismos sin esporas. Sin embargo, las especies tuberculosas podrían ser consideradas incluso más

resistentes, debido a su tolerancia al pH ácido, permitiendo resistir a la destrucción cuando se encuentran dentro de los macrófagos del hospedador. Son sensibles al calor húmedo y pueden llegar a ser destruidas con temperaturas elevadas como con la pasteurización, pero resistentes a temperatura muy bajas (congelación) durante periodos de tiempo prolongados, sin verse alterada su viabilidad.

En 1998 [Cole 1998] se consiguió secuenciar el genoma completo de ADN circular de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv, el cual tiene un tamaño de 4.411.532 pb, con un contenido de G+C del 65,6% [Cole 2002]. Se ha estimado que hay 4.173 genes, teniendo algo más de la mitad de ellos una función biológica asignada, mientras que la del resto aún es desconocida [Camus 2002]. Parte del genoma de H37Rv está constituido por profagos (tipo phiRv 1 y phiRv 2) y por secuencias de inserción pertenecientes a las familias IS3, IS5, IS21, IS30, IS110, IS256, ISL3 e IS1535.

1.1.2. Mycobacterium leprae

La lepra es una enfermedad contagiosa crónica causada por *M. leprae*, y que afecta fundamentalmente a la piel y los nervios periféricos. En 2018, se registraron 208.619 casos nuevos de lepra en el mundo, según cifras oficiales provenientes de 127 países [WHO Leprosy update 2019]. Esta micobacteria, patógena intracelular y no cultivable en medios de cultivo bacteriológicos, fue descubierta en 1873 por el médico noruego G. A. Hansen, debido a lo cual también se le denomina “bacilo de Hansen”. La transmisión es por contagio prolongado a partir del ser humano, principalmente por vía aérea, y se ve favorecida por condiciones de pobreza, falta de higiene y desnutrición. Las manifestaciones clínicas dependen de la reacción inmunitaria del paciente frente a las bacterias. Se diferencian tres formas clínicas:

- 1) Lepra indeterminada: forma inicial en todos los pacientes. Las lesiones más frecuentes son máculas eritematosas en escasa cantidad, de bordes mal delimitados, que aparecen en la cara, extremidades o nalgas.
- 2) Lepra tuberculoide: sucede en aquellos pacientes con un grado de resistencia bueno, mostrando una importante reacción inmunitaria celular con linfocitos y granulomas. Por el contrario, las bacterias producen citocinas (igual que en las infecciones por *M. tuberculosis*) que activan a los macrófagos, la fagocitosis y la

eliminación de los bacilos. El cuadro clínico se limita sólo a la piel y los nervios. Las lesiones cutáneas aparecen por el tronco, glúteos, muslos y cara. La carga bacilar es baja.

3) Lepra lepromatosa: la cantidad de bacilos es abundante, y el paciente infectado desarrolla una importante respuesta humoral, además de una respuesta celular frente a los antígenos de *M. leprae*. Se observan un gran número de bacterias en los macrófagos dérmicos y en las células de Schwann de los nervios periféricos. Es la forma más infecciosa y generalizada de lepra, afectando a la mayoría de los órganos y con numerosas lesiones cutáneas en cara, tronco y extremidades, además de contar con la presencia de la *facies leonina* (múltiples lepromas faciales). La zona nasal, ocular y testicular se pueden ver afectadas por úlceras sangrantes con destrucción del tabique nasal, queratitis y atrofia del iris, y esterilidad y ginecomastia, respectivamente.

Para el diagnóstico de la lepra, la muestra se obtiene de la piel o de la mucosa nasal raspando mediante un bisturí, y se tiñe mediante la técnica de Ziehl-Neelsen. También se puede llevar a cabo una identificación genómica directa ya que no crece en los medios de cultivo bacteriológicos. Desde 1981, la OMS recomienda el tratamiento con varios fármacos que incluyen Dapsona, Rifampicina y Clofazimina durante 6 meses en los casos paucibacilares, y durante 12 meses en aquellos con una mayor concentración bacilar.

1.1.3. Micobacterias no tuberculosas

Los aislamientos de micobacterias no tuberculosas (MNT) o ambientales son cada vez más frecuentes en los laboratorios de microbiología, destacando *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium abscessus* [Alcaide 2017; Lin 2018; Martínez González 2017; Santin 2018]. Estas bacterias generalmente son ambientales y rara vez actúan como patógenos para los humanos al ser de baja o escasa virulencia. Sin embargo, pueden ser responsables de enfermedades oportunistas en determinados pacientes. Se suelen aislar del agua, principalmente, pero también del suelo, el polvo y de las plantas.

En 1959, Runyon elaboró una clasificación de las MNT que hoy en día sigue teniendo cierta utilidad, dividiendo estas micobacterias en cuatro grupos [Runyon 1959], en base a la velocidad de crecimiento (desarrollar colonias en medio sólido en menos de 7 días, o en más tiempo) y a la pigmentación: fotocromógenas de crecimiento lento, escotocromógenas de crecimiento lento, micobacterias no pigmentadas de crecimiento lento, y micobacterias de crecimiento rápido.

En cuanto a las patologías, en el caso de las MNT de crecimiento lento a menudo son responsables de enfermedades pulmonares (*M. avium* complex, *M. xenopi*, y *M. kansasii*) y alteraciones de los nódulos linfáticos (*M. avium* complex). Por otro lado, las MNT de crecimiento rápido afectan predominantemente a las articulaciones, huesos y piel (*M. fortuitum*, *M. chelonae*, y *M. abscessus*). A pesar de esto, también pueden aparecer infecciones diseminadas causadas por MNT, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, como en el caso de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En este tipo de infecciones el aparato respiratorio y el tracto gastrointestinal son las zonas más afectadas, con fiebre, dolor abdominal, pérdida de peso, hepatomegalia y esplenomegalia.

La realización de las pruebas de sensibilidad a los fármacos antimicobacterianos está indicada en aislamientos de pacientes con significación clínica y en determinados microorganismos. Actualmente existen técnicas comerciales de microdilución que permiten realizar el estudio de sensibilidad en el laboratorio de manera sencilla, rápida y reproducible, tanto para las MNT lentas, como para las MNT rápidas. No obstante, aún son de difícil interpretación para múltiples fármacos y especies micobacterianas.

2. TRANSMISIÓN Y PATOGENIA DE LA TUBERCULOSIS

2.1. Mecanismo de transmisión de la tuberculosis

En la mayoría de los casos, el mecanismo de transmisión de la tuberculosis en humanos es por vía aérea, inhalando las gotas de secreción (gotas de *Flügge*) que contienen el bacilo. De forma habitual, cuando las gotas son mayores de 5 μm , en el exterior pierden una parte de su contenido acuoso por evaporación y caen al suelo, o

se expulsan mediante el barrido ciliar de las células de la mucosa nasal si han sido captadas por la nariz. Sin embargo, cuando un enfermo de tuberculosis habla o tose, expulsa gotas de menor tamaño (1-5 μm) que pueden quedar en suspensión por un tiempo variable, y al ser tan pequeñas, pueden llegar a los alveolos si estas son inhaladas [Sonkin 1951].

Las probabilidades de estar en contacto con una persona enferma de tuberculosis, que esta persona sea bacilífera, la duración de ese contacto, y el ambiente donde se da el mismo son factores importantes en la transmisión del bacilo tuberculoso. De este modo, aquellos esputos que contengan una mayor proporción de bacilos ácido-alcohol resistentes y, por tanto, visibles en el microscopio, tendrán mayor importancia en la propagación de la enfermedad que aquellos con una baciloscopia negativa, aunque tengan un cultivo micobacteriano positivo, ya que serán menos contagiosos.

2.2. Patogenia: conceptos generales

Una vez que el bacilo tuberculoso entra en contacto con el ser humano, pueden darse hasta cuatro escenarios distintos:

- 1) El sistema inmune elimina las micobacterias, con lo cual no hay infección.
- 2) El bacilo se queda dormido indefinidamente dentro del huésped, dando lugar a una infección tuberculosa latente.
- 3) Las micobacterias causan la enfermedad (tuberculosis activa) por primera vez en el hospedador (tuberculosis primaria).
- 4) Se activan y causan la enfermedad varios años después de la infección (tuberculosis secundaria).

Cuando el bacilo llega a los alveolos (Figura 1), es fagocitado por los macrófagos alveolares, principal elemento de defensa del hospedador. Los macrófagos tratan de inhibir el crecimiento del bacilo mediante la fagocitosis, además de presentar el antígeno y estimular los linfocitos T. Sin embargo, *M. tuberculosis* es considerado un agente patógeno intracelular, que sobrevive a la digestión lisosómica y a la apoptosis secretando un péptido (ESAT-6), que permite finalmente la entrada del bacilo en el citoplasma [Mitchell 2016]. Una vez ahí, el bacilo se multiplica en el interior del macrófago hasta destruirlo, convirtiéndose de nuevo en bacilos extracelulares que

vuelven a ser fagocitados por los macrófagos alveolares [Cardona 2018]. Este hecho conlleva que se liberen citocinas y quimiocinas. Algunas de las principales citocinas implicadas son el factor de necrosis tumoral (TNF- α) para controlar el crecimiento del bacilo tuberculoso y la formación de granulomas, y también interferón gamma (IFN- γ), IL-1 α/β , IL-6, IL-12 y IL-18 [Zúñiga 2012]. Las quimiocinas son las encargadas de atraer más células inflamatorias al lugar de la infección, reforzando el ataque contra el bacilo, atrayendo neutrófilos y células T.

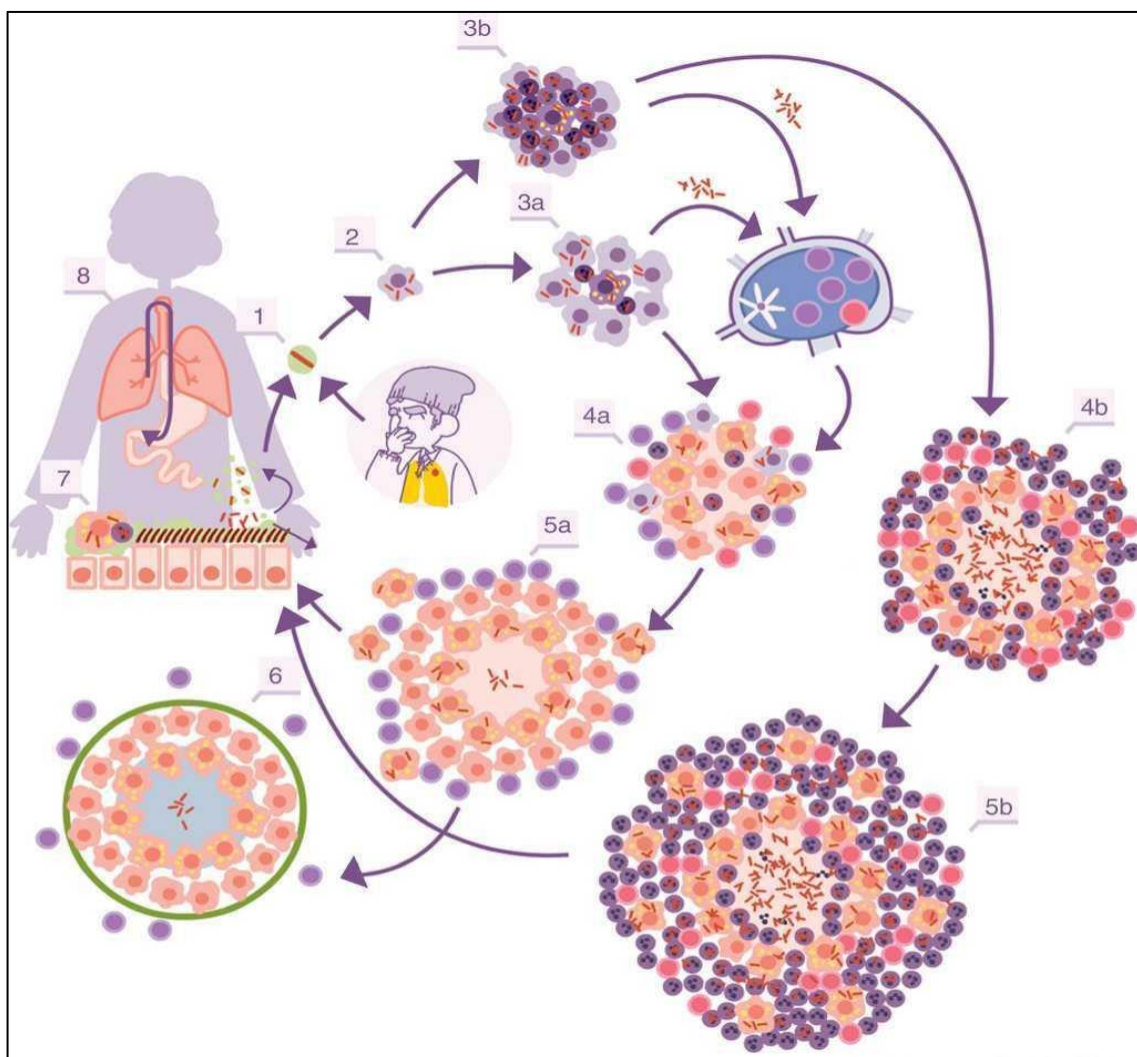


Figura 1. Ciclo infeccioso de *Mycobacterium tuberculosis* [Cardona 2018]. 1. Entrada de bacilos al alvéolo pulmonar a través de una gota de aerosol. 2. Fagocitosis por parte de un macrófago alveolar y multiplicación en su interior. 3. Destrucción del macrófago alveolar y diseminación de *M. tuberculosis* generando la liberación de monocitos (3 a) u otras células polimorfonucleares como los neutrófilos (3 b). 4. Proliferación de células T para controlar las micobacterias, ya sea mediante linfocitos Th1 (4 a) o Th17 (4 b). 5. Formación del granuloma (5 a; 5 b) para evitar la propagación de micobacterias. 6. La zona central del granuloma o *caseum* se encapsula. 7. Sin embargo, el *caseum* puede licuarse y liberar los bacilos que había en su interior, y diseminarse a través de los vasos linfáticos, sanguíneos y los bronquios (8).

El siguiente paso es controlar la proliferación de micobacterias mediante las células T, que se organizan en granulomas, es decir, en una estructura esférica para tratar de aislar un agente infeccioso que no se ha podido eliminar previamente. De este modo se contienen a las micobacterias dentro de las paredes del granuloma evitando su propagación. La zona central del granuloma puede presentar una necrosis incompleta que origina el material caseoso o *caseum*, que es avascular y anóxica, de modo que inhibe el crecimiento de los bacilos, así como la función macrófaga. Alrededor de esta zona central se encuentran macrófagos activados que están destruyendo los bacilos, y también macrófagos inactivos que mueren y son añadidos a este *caseum*. Los centros caseosos pequeños (0,1-8,0 mm de diámetro) pueden ser eliminados por los macrófagos cercanos o enzimas hidrolíticas extracelulares e intracelulares. En caso de que el *caseum* sea mayor, de 5 a 20 mm, éste es revestido por un encapsulado fibroso, quedando aislado dentro del hospedador [Dannenberg 1989]. Si estos granulomas se calcifican y su tamaño es suficiente, pueden llegar a detectarse en una radiografía simple.

Cuando la hipersensibilidad del hospedador es buena y la carga bacilar no es muy elevada, el granuloma se destruye y el tejido cicatriza correctamente. En cambio, cuando hay muchos bacilos tuberculosos, el *caseum*, que es inestable, puede licuarse por la acción de enzimas hidrolíticas de los macrófagos [Dannenberg 1976] y generar las denominadas cavernas tuberculosas o cavidades (lesión cavitada), que contienen muchos bacilos en su interior que pueden llegar a diseminarse a través de los vasos linfáticos, sanguíneos y de los bronquios. Los linfocitos CD4 destruyen prácticamente todos los bacilos tuberculosos (90%). El resto de población bacilar, en su mayoría, acaba siendo destruida previa fibrosis y reabsorción del granuloma. Tan solo en muy pocos casos los bacilos quedan en estado durmiente dentro de los macrófagos generando la denominada tuberculosis latente, donde los bacilos tuberculosos quedan dentro de los macrófagos del granuloma sin replicarse y, en condiciones adecuadas como una alteración del sistema inmunitario, se reactivarán atacando a los bronquios cercanos, propagando las micobacterias a otras áreas del pulmón y provocando la tuberculosis activa [Zúñiga 2012].

2.3. Patogenia: Hipótesis dinámica

Tradicionalmente se ha afirmado que los individuos, una vez infectados de tuberculosis, pueden mantener en su organismo bacilos latentes en lesiones anteriores, hasta que se reactiven, por determinados factores o situaciones, dando lugar a una tuberculosis activa. No obstante, la presencia de estos bacilos solo se puede predecir por métodos inmunológicos indirectos, como la prueba de la tuberculina o por ensayos de liberación de interferón-gamma (IGRA).

A principios del siglo XXI, apareció una nueva teoría sobre el ciclo de infección del bacilo tuberculoso que trata de explicar los motivos de la reinfección e infección latente: la “hipótesis dinámica” [Cardona 2009]. Esta teoría sugiere que la infección latente de tuberculosis es causada por la reinfección endógena constante de bacilos latentes. Para ello, afirma que los bacilos que están dentro de macrófagos alveolares infectados localizados en el granuloma (macrófagos espumosos) no permanecen ahí, sino que por un cierto reflujo inverso van pasando a formar parte de los aerosoles que se generan en los pulmones del hospedador. Con este movimiento, los aerosoles con macrófagos infectados generan nuevos puntos de infección en el parénquima pulmonar, ante la cual los linfocitos T no pueden actuar (ya que la inmunidad específica se produce solamente tras la migración de células dendríticas de los nódulos linfáticos). De esta manera el paciente se re infecta continuamente, llegando a convertirse en una tuberculosis activa y causando la enfermedad en un 10% de las personas infectadas.

2.4. Comorbilidades de tuberculosis y factores de riesgo

A lo largo de los años, se han ido observando múltiples factores que parecen estar relacionados con el desarrollo de la tuberculosis en las personas.

2.4.1. VIH

La tuberculosis es la enfermedad que más comúnmente se presenta en enfermos de VIH, incluyendo a aquellos que están tomando un tratamiento antiretroviral, y es la principal causa de mortalidad relacionada con el VIH. En 2018, 862.000 personas con VIH enfermaron de tuberculosis, falleciendo 251.000 (29,1%) personas VIH-positivas por tuberculosis. El riesgo de enfermar después de la infección está relacionado con la

respuesta inmune del hospedador, de forma que aquellas personas con un sistema inmune más debilitado tendrán una probabilidad mayor de desarrollar la enfermedad tuberculosa después de la infección. En el caso de las personas infectadas con el VIH, el riesgo de desarrollar tuberculosis activa es de 15-22 veces más, respecto a la población general [WHO Tuberculosis facts 2018].

Entre los casos notificados de tuberculosis con VIH, el 84% de ellos recibían terapia antirretroviral. Esta terapia, conocida como TARGA e implantada desde 1996, incrementa la esperanza y calidad de vida de las personas infectadas por el virus [dos Santos 2014].

2.4.2. Diabetes

La diabetes es una de las comorbilidades más comunes en personas con tuberculosis (asociada en el 15% de los casos), llegando a triplicar el riesgo de desarrollarla [WHO Tuberculosis & Diabetes 2016]. Aquellas personas con un sistema inmune más débil debido a una enfermedad crónica como la diabetes tienen un mayor riesgo de que una tuberculosis latente evolucione a una tuberculosis activa. Esta predisposición por parte de los pacientes diabéticos se cree que puede ser debida a alteraciones en la defensa pulmonar del hospedador, alterando los mecanismos de eliminación del bacilo o debilitando las funciones de la inmunidad celular pulmonar [Koziel 1995]. El seguimiento clínico de estos pacientes ha de ser muy cuidadoso, debido a que la diabetes puede afectar el curso clínico de la tuberculosis, y esta última puede llegar a alterar el control de la glucemia en las personas diabéticas.

La prevención y el cuidado de la diabetes es de gran importancia por el incremento en la prevalencia y el aumento de los casos de tuberculosis asociados con diabetes. Para ello la OMS ha creado varios programas nacionales con el fin de mejorar el cribaje y manejo en estos pacientes.

2.4.3. Desnutrición y pobreza

La prevalencia de la desnutrición en personas con tuberculosis suele ser elevada, debido a que afecta el sistema inmune (en especial a los linfocitos T), así como la tuberculosis puede dar lugar a una desnutrición, por la activación de las citocinas, un

metabolismo proteico anómalo y pérdidas en las reservas de las grasas [Macallan 1999].

Aunque la desnutrición no es exclusiva de la población pobre, sí se suele observar una clara asociación entre la pobreza y la desnutrición, ambos conceptos ligados a la tuberculosis. Los países con una renta *per cápita* menor, tienen tasas más altas de enfermedades y mortalidad atribuida a la tuberculosis. En consonancia con este hecho, se observan más casos de tuberculosis en aquellas áreas o zonas más desfavorecidas socio-económicamente [Sanz-Peláez 2006].

2.4.4. Hábitos tóxicos

Dentro de los hábitos tóxicos, hay tres grandes factores de riesgo a tener en cuenta: el tabaco, el alcohol y el uso de drogas por vía parenteral.

La adicción al tabaco se asocia en el 20% de los casos de tuberculosis. La OMS estima que se multiplica por 2,5 el riesgo de desarrollar tuberculosis en aquellas personas que fuman tabaco [WHO Tuberculosis & Tobacco 2009], aumentando la probabilidad a mayor número de cigarrillos fumados [Alcaide 1996]. Por este motivo, es aconsejable preguntar al paciente enfermo de tuberculosis si fuma, y proporcionarle consejos sobre cómo dejar de fumar para así mejorar la salud pulmonar. El gran problema radica en la elevada prevalencia del tabaquismo en la población, de modo que una reducción de esta ayudaría a minimizar el impacto en la incidencia de la tuberculosis.

En cuanto al alcohol, su consumo nocivo, la dosis y los problemas relacionados con él se asocian a un mayor riesgo (tres veces más) de desarrollar tuberculosis [Imtiaz 2017]. Esto se debe a que el consumo de alcohol afecta a la adherencia de los macrófagos (reduciendo la fagocitosis de las micobacterias) y a la activación de los linfocitos T, de modo que la susceptibilidad a padecer tuberculosis y tener una reactivación de la tuberculosis latente es mayor. Al mismo tiempo, un paciente alcohólico presentará una menor adherencia terapéutica al tratamiento (será menos cumplidor) en comparación a aquel paciente que no lo sea.

Los usuarios de drogas siguen siendo un grupo de riesgo asociado con la infección de la tuberculosis, así como la propia enfermedad. En especial, el riesgo de desarrollar tuberculosis es muy elevado en aquellos usuarios de drogas por vías parenterales,

generalmente asociados con el VIH [Deiss 2009]. La observación directa del tratamiento en estos pacientes es esencial para lograr un correcto cumplimiento y una buena adherencia.

2.4.5. Edad y sexo

Un factor más que influye en el riesgo de enfermar de tuberculosis una vez infectado es la edad. En aquellos países con baja renta per cápita, la tuberculosis se da más en gente joven, sobre todo por una primoinfección, y en menor medida por una reactivación bacilar [Marais 2014]. Por el contrario, en los países con una renta per cápita más elevada, la tuberculosis se desarrolla con más frecuencia en personas mayores, debido principalmente por una reactivación de una tuberculosis latente. La explicación a este hecho parece ser que es por la coexistencia de otras enfermedades que debilitan el sistema inmune, favoreciendo la reinfección o reactivación bacilar.

En relación con el sexo, si se observa la incidencia de la tuberculosis en los niños, la proporción es prácticamente igual entre niños y niñas. Sin embargo, a partir de la adolescencia, hay más casos de tuberculosis en hombre que en mujeres [WHO Tuberculosis Report 2020]. El hecho de que los índices de notificación de tuberculosis sean más elevados en los hombres puede obedecer en parte a diferencias epidemiológicas (exposición, riesgo de infección y progresión de la enfermedad).

2.4.6. Otras afecciones

Hay ciertas enfermedades o afecciones dónde el sistema inmunitario se ve debilitado y que están relacionadas con la tuberculosis. Entre ellas, destacan:

- *Cáncer*: La tuberculosis también se asocia en pacientes con cáncer, especialmente aquellos de cuello, hematológicos y de pulmón, llegando a tener una tasa nueve veces mayor de desarrollar tuberculosis activa en comparación con aquellos pacientes sin cáncer [Cheng 2017].
- *Silicosis*: También conocida como silicotuberculosis, es la tuberculosis asociada a mineros y personas afectadas de silicosis. Un enfermo de silicosis tiene un riesgo de padecer tuberculosis 30 veces mayor que una persona sana [ATS and CDC 2000].
- *Glucocorticoides*: Hay fármacos, como los glucocorticoides, que causan una inmunosupresión y que, por lo tanto, predisponen al paciente que los toma a

desarrollar tuberculosis. Hay estudios que afirman que los pacientes tratados con estos fármacos tienen incrementado en cinco veces el riesgo de padecer tuberculosis, independientemente de otros factores de riesgo [Jick 2006].

· *Trasplantes y tratamientos inmunosupresores*: Las tasas y el riesgo de tuberculosis en los receptores de trasplantes dependen de factores como la frecuencia de tuberculosis en la población receptora y donante, y el órgano trasplantado (el más alto en receptores de trasplante de pulmón). En estos pacientes, el riesgo de desarrollar la enfermedad está relacionado también con los fármacos inmunosupresores, en especial los anti-TNF, dónde se ha detectado un mayor riesgo [Mir Viladrich 2016].

3. EPIDEMIOLOGIA Y TRANSMISIÓN

3.1.1. Situación de la tuberculosis en el mundo

La tuberculosis sigue siendo una de las enfermedades infecciosas más importantes en el mundo, situándose entre las diez principales causas de mortalidad en el mundo (la primera causada por un solo agente infeccioso), y por encima del VIH [WHO Tuberculosis Report 2020]. De acuerdo con el último informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que el 23% de la población mundial está infectada de tuberculosis en estado latente, de modo que están en riesgo de desarrollar una tuberculosis activa a lo largo de sus vidas.

La OMS, además, estimó que hubieron cerca de 10 millones de casos nuevos en el año 2019, lo que supone una media global de 130 casos por 100.000 habitantes (Figura 2). Por zonas geográficas, el mayor número de casos en 2019 se dieron en la región del sudeste asiático (44%), África (25%) y la zona oeste del pacífico (18%). En menor medida les siguen la región este del mediterráneo (8,2%), las Américas (2,9%) y la zona europea (2,5%). Si por el contrario se tiene en cuenta la incidencia por países, un total de ocho países representaron dos tercios de la incidencia global: India (26% de casos), Indonesia (8,5%), China (8,4%), Filipinas (6%), Pakistán (5,7%), Nigeria (4,4%), Bangladesh (3,6%) y Sudáfrica (3,6%).

INTRODUCCIÓN

En cuanto a la mortalidad, de los casi 10 millones de personas que enfermaron de tuberculosis en el mundo, fallecieron 1,4 millones por esta enfermedad. En 2019 se notificaron 456.426 personas con VIH que enfermaron de tuberculosis [WHO Tuberculosis Report 2020].

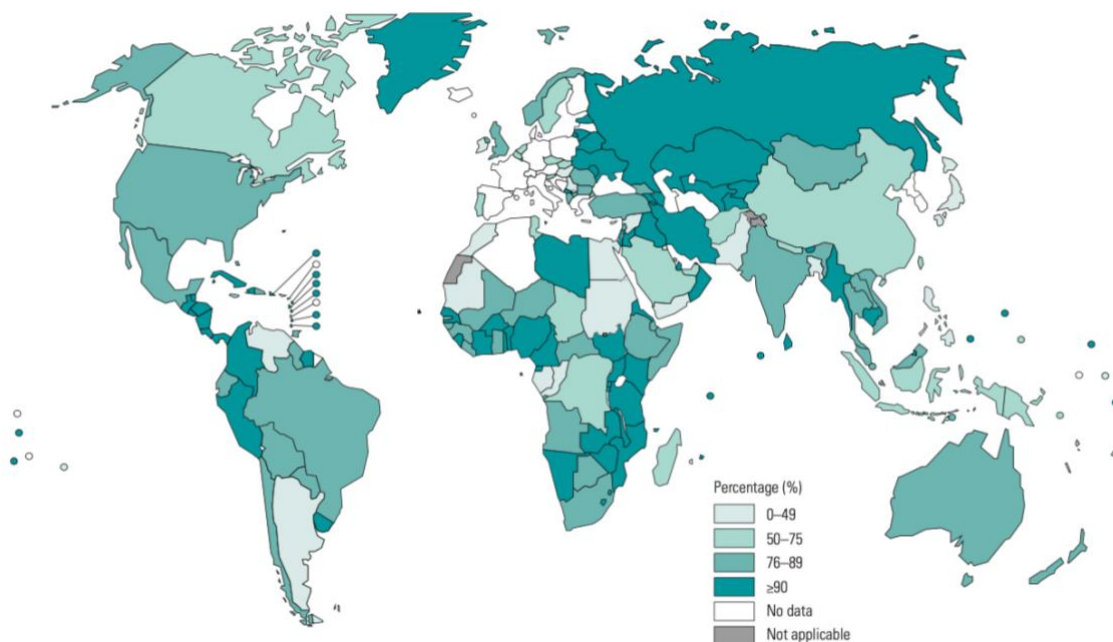


Figura 2. Porcentaje de casos de pacientes enfermos de tuberculosis con coinfección por el VIH [WHO Tuberculosis Report 2020].

A nivel mundial, la incidencia de la tuberculosis se va reduciendo cada año un 2%, aproximadamente, pero no tan rápido como se esperaba para lograr alcanzar las metas de la “Estrategia Fin a la TB”. La presencia de cepas multirresistentes representa cada vez un mayor problema de salud pública y una amenaza para la seguridad sanitaria, dificultando los programas de control que elabora la OMS para esta enfermedad. En el último informe de la OMS, se estimó que en 2018 hubieron cerca de 500.000 casos nuevos de resistencia a la Rifampicina, el fármaco de primera línea más eficaz contra la tuberculosis, y el 78% de ellos (390.000 personas, aproximadamente) presentaron tuberculosis multirresistente (MDR-TB). Los tres países con una mayor cantidad de casos multirresistentes fueron India (27%), China (14%) y los países que conforman la federación rusa (9%). Asimismo, el 6,2% (casi 24.000 personas) de los casos MDR-TB desarrollaron una tuberculosis con resistencia extendida (XDR-TB) o extremadamente resistente.

3.1.2. Situación de la tuberculosis en Europa

En Europa, el último informe del ECDC que presenta los datos de vigilancia de la tuberculosis en el año 2017, estimó que para ese mismo año se notificaron cerca de 280.000 casos de tuberculosis [ECDC 2019], lo que supone una media global de 30 casos por 100.000 habitantes (Figura 3).

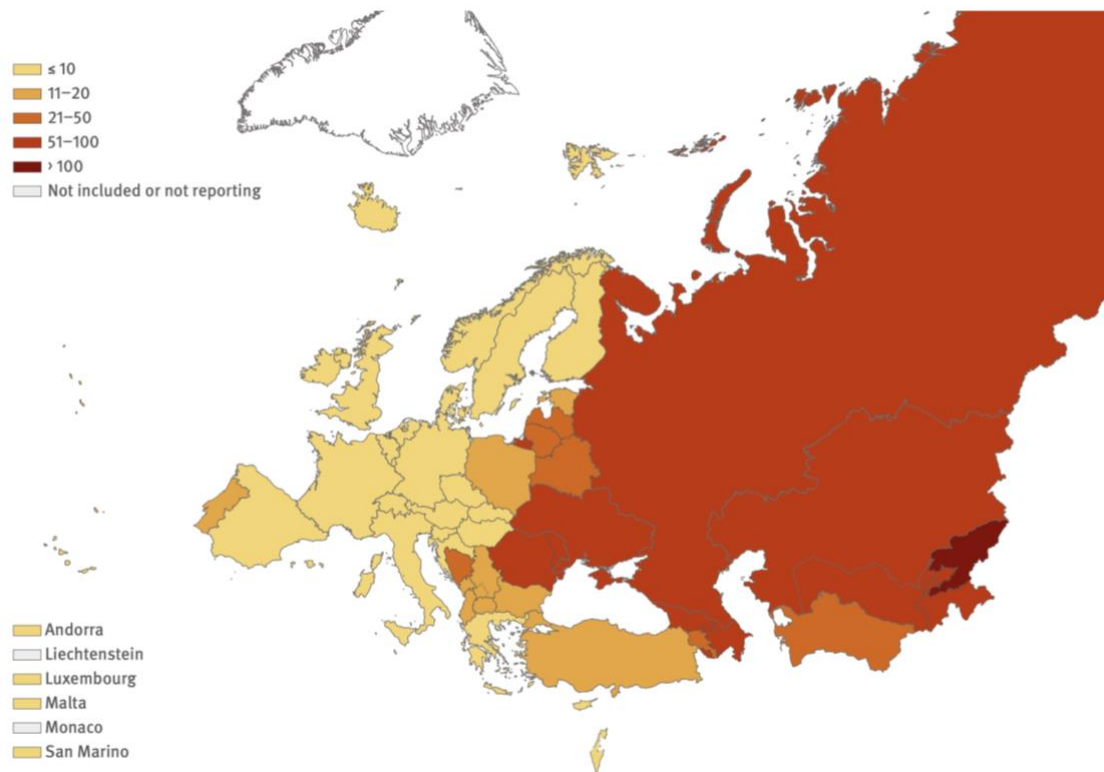


Figura 3. Distribución de casos de tuberculosis notificados por cada 100.000 habitantes en la región europea en 2017 [ECDC 2019].

En la mayoría de los países de la comunidad europea, tanto las notificaciones como la incidencia han ido disminuyendo durante los últimos cinco años. Sin embargo, hubo países que notificaron más casos que los de la media europea. Los nueve países con más casos por cada 100.000 habitantes en la región europea a lo largo de 2017 fueron Moldavia (82,9), Kazajistán (68,4), Georgia (66,4), Tayikistán (66,1), Rumania (62,7), Ucrania (61,6), la federación rusa (58,7), Azerbaiyán (53,2) y Uzbekistán (52,8), todos ellos países del este de Europa.

En cuanto a la mortalidad, se estima que fallecieron cerca de 24.000 personas enfermas de tuberculosis en Europa en 2017, que a su vez eran VIH-negativas. En lo

que respeta a la coinfección con el VIH en ese mismo año, se estima que 26.000 personas (3,9%) con el VIH enfermaron de tuberculosis [ECDC 2019].

En 2017 se notificaron 1041 (3,8%) casos MDR-TB, todos ellos disponían del resultado de la prueba de sensibilidad a los fármacos antituberculosos. De ellos, el 24,3% (770 casos) fueron XDR-TB.

3.1.3. Situación de la tuberculosis en España

En España, el último informe epidemiológico del Ministerio de Sanidad presenta los datos relativos al año 2018, donde se notificaron 4.386 casos, lo que equivale a una media global de 9,39 casos por 100.000 habitantes [Plan Prevención y control TB 2019]. Desde el año 2012 la incidencia total ha descendido un 6% de media al año: la tasa pasó de 12,94 casos notificados por 100.000 habitantes (5.975 casos en 2012) a 9,39 por 100.000 habitantes (4.386 casos en 2018).

Por comunidades autónomas, las tasas de incidencia por 100.000 habitantes oscilan considerablemente entre ellas, siendo Galicia (19,60), Cantabria (13,25) y Cataluña (12,56) las regiones con más notificación de casos de tuberculosis [Plan Prevención y control TB 2019]. En lo que respecta a Cataluña, los últimos datos sobre la situación epidemiológica de la tuberculosis en la comunidad catalana corresponden al año 2017 [Generalitat de Catalunya 2019], donde se expone que la tasa de incidencia de tuberculosis fue de 13,2 casos por 100.000 habitantes (999 casos declarados). Un 1% (siete casos) eran MDR-TB, pero ninguno de ellos fue XDR-TB.

La vigilancia de la tuberculosis en España se encuentra regulada legislativamente desde 1995, cuando se creó la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE), la cual es de carácter descentralizado. Sin embargo, en España existe una monitorización insuficiente para la tuberculosis, siendo de los pocos países dónde no se notifican datos relevantes como los resultados del tratamiento, la coinfección con el VIH, los resultados de los test de sensibilidad a los fármacos de primera y segunda línea en caso de ser necesarios, o los datos referentes a la tuberculosis extrapulmonar, por ejemplo. Este hecho conlleva a que los organismos internacionales incluyan a España dentro de los países con estadísticas poco fiables sobre la tuberculosis [WHO Tuberculosis Report 2019]. La infra-notificación queda patente en los datos referentes

a la resistencia de los fármacos contra la tuberculosis: en 2018 se notificaron 46 casos que eran MDR-TB y XDR-TB, si bien es cierto que esta información solo fue disponible en el 32% de los casos [Indicadores RENAVE 2018].

Por todo ello, se han realizado varios estudios a lo largo de los años que pretendían determinar la verdadera situación de la infección por MTUBC en el país, llevados a cabo por diferentes grupos de trabajo e investigación como el Programa Integrado de Investigación en Tuberculosis (PII-TB) de la SEPAR, el GEM en 2008 [Jiménez 2008] y la UITB [Martín-Casabona 2000]. Estos y otros estudios también analizaron datos relativos a la enfermedad, como su relación con el tabaquismo y la mortalidad [Rodrigo 2016], la ya mencionada infra-declaración de datos [Morales-García 2015] y cumplimiento del tratamiento en pacientes enfermos de tuberculosis [Caylà 2004]. A pesar de ello, estos estudios eran parciales en cuanto a las zonas geográficas analizadas y los periodos de tiempo estudiados.

Otro aspecto muy interesante derivado de esta monitorización insuficiente es ver cómo han evolucionado las resistencias en el tiempo. Muy pocos trabajos analizan la evolución y situación de la resistencia a la tuberculosis en España [Blanquer 2014; Caminero 2003; Jiménez-Fuentes 2016; Martín-Casabona 2000], sin embargo, entre sus limitaciones destacan el hecho de abarcar periodos de estudio cortos y/o no son trabajos que puedan dar una imagen representativa reciente de esta enfermedad en el país.

3.2. Flujos migratorios

La influencia del fenómeno migratorio sobre la tuberculosis es cada vez más importante, especialmente si el flujo de personas proviene de regiones con tasas elevadas de tuberculosis. En los países más ricos, el porcentaje de casos de tuberculosis en la población autóctona se está viendo disminuido a costa del incremento de casos de la población extranjera.

En España, los flujos migratorios se han modificado drásticamente desde inicios del siglo XXI, cuando este ha pasado a ser un país receptor de inmigrantes. La mayoría de los inmigrantes proceden de países con una alta incidencia de tuberculosis, lo que ha supuesto que la contribución de esta población a los nuevos casos de tuberculosis sea

relativamente superior en comparación al peso que representan en el conjunto de la población [Sánchez-Montalvá 2017]. Según los últimos datos oficiales, el 23% de los casos notificados en España en 2018 correspondían a personas nacidas en otros países [Infografía TB Spain 2018], mientras que en Cataluña, en 2017, el porcentaje de casos de tuberculosis en extranjeros fue del 48,3% [Generalitat de Cataluña 2019]. Estos porcentajes, nada despreciables, constatan la relevancia de los flujos migratorios en el control de la enfermedad tuberculosa.

Una vez se ha contrastado su importancia, el siguiente punto del estudio del flujo migratorio sería analizar el riesgo de desarrollar una tuberculosis en el país de acogida, y saber si la persona inmigrante tendrá una reactivación o bien una infección aguda. En el primer caso, donde sucede una activación de una infección adquirida en el país de origen, los factores que intervendrían son el hospedador, el patógeno y la interacción entre ambos. Por el contrario, en el segundo caso (infección aguda adquirida en el nuevo país), esta situación vendrá definida, además, por la tasa de tuberculosis en la comunidad (relacionadas con las condiciones laborales y de vida, infraestructuras y programas sanitarios). Sin embargo, al depender de tantos factores, ambas situaciones podrían llegar a complementarse. Es por ello que el sistema de salud pública precisa de esfuerzos y recursos adicionales para la prevención y control de la tuberculosis.

3.3. Estudios epidemiológicos de la transmisión: Tipado molecular

El tipado molecular de las diversas cepas de *M. tuberculosis* complex es esencial para saber cómo se distribuyen estas cepas entre la población y conocer mejor su transmisión a través de ella. De esta manera se obtiene un mayor conocimiento sobre su epidemiología, y, por tanto, un mejor control de la tuberculosis. La tipificación molecular o genotipado tiene como objetivo analizar secuencias de ADN repetidas y conservadas que se encuentran dentro del genoma de *M. tuberculosis* complex. En micobacterias, las secuencias repetitivas de ADN más estudiadas son las secuencias de inserción (*interspersed sequences*; IS), el locus CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) y las *tándem repeats* (TR).

3.3.1. IS6110

La secuencia de inserción 6110 es la más grande dentro de la familia IS3, con 1.355 pb. Las especies agrupadas dentro del complejo *M. tuberculosis* presentan varias copias (de 1 a 25) de IS6110 a lo largo de su genoma, con la excepción de *M. bovis*, que tan solo presenta una copia [Thierry 1990]. El número de copias depende de la frecuencia de transposición, y pese a que su ubicación suele ser aleatoria, existen ciertos puntos de integración (*hot spots*) donde la frecuencia de transposición es mayor [Wall 1999].

Tradicionalmente, IS6110 ha sido la secuencia de repetición empleada en el método de referencia para el tipado molecular de cepas de *M. tuberculosis* complex, basado en el polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP). La gran utilidad radica tanto en su variabilidad para diferenciar clones, como en su estabilidad para relacionar cepas de pacientes relacionados epidemiológicamente (se estima que el patrón de bandas de IS6110 se mantiene estable durante casi cuatro años). Se considera que dos cepas pertenecen al mismo clon, si tienen el mismo número y posición de las bandas. En caso de variar tan solo en una o dos bandas, significa que estuvieron relacionadas en algún momento del pasado, pero si difieren en más de dos bandas se consideran dos clones totalmente separados epidemiológicamente [van Embden 1992].

Pese a todo esto, las técnicas basadas en esta secuencia de inserción han ido perdiendo peso con el paso del tiempo, debido en gran parte a sus limitaciones: se requiere mucho inóculo de la cepa a estudiar, la metodología es compleja, su coste es elevado en comparación a otras técnicas y el poder discriminatorio es bajo en determinadas situaciones.

3.3.2. Spoligotyping

Esta técnica se basa en el polimorfismo del locus CRISPR, específico de *M. tuberculosis* complex [Kamerbeek 1997]. Este locus contiene múltiples secuencias cortas de repetición de 36 pb conocidas como DR (*direct repeat*). Estas DR se encuentran separadas por secuencias espaciadoras de 34-41 pb. Entre cepas, el número de DR y la presencia o ausencia de espaciadores puede variar. Con esta técnica se amplifica por PCR las secuencias de repetición del locus (CRISPR) y se detecta si hay o no hay los espaciadores mediante una hibridación reversa.

INTRODUCCIÓN

En comparación a la RFLP del IS6110, este método no necesita tanto inóculo de la cepa, y el resultado sobre si hay o no zona espaciadora se puede expresar de manera numérica. Pese a ello, la técnica del *spoligotyping* tiene un menor poder de discriminación que el IS6110.

3.3.3. MIRU

Las MIRU (*mycobacterial interspersed repetitive units*) son secuencias homólogas de 46 a 101 pb dispersas en regiones intergénicas a lo largo del genoma de *M. tuberculosis* complex. Estas secuencias son unidades monoméricas que se repiten periódicamente (*tandem repeats*), y se calcula que hay entre 200 y 300 en este complejo micobacteriano.

En *M. tuberculosis* complex se han descrito 41 *loci* de MIRU, y al menos 12 de ellos presentan suficiente variabilidad entre cepas como para ser utilizadas como marcador de tipado epidemiológico [Supply 1997]. La técnica consiste en amplificar por PCR los 12 loci de MIRU y determinar el tamaño de los fragmentos amplificados, lo cual indica el número de unidades repetidas, mediante un gel de electroforesis, y expresando los resultados de manera numérica. Además, es más sencillo que el IS6110, y tiene un poder discriminatorio superior al del *spoligotyping*.

3.3.4. WGS

El avance más reciente en la epidemiología molecular es disponer de la tecnología de secuenciación completa del genoma (*Whole genome sequencing*; WGS). Esta técnica se usa cada vez más para estudios de transmisión epidemiológica, ya que tiene un poder discriminatorio más alto en comparación con los otros métodos de tipado molecular. Los datos generados por IS6110, *spoligotyping* y MIRU pueden determinar qué pacientes forman parte de una cadena de transmisión, pero no siempre permiten distinguir la cadena de eventos, es decir, el orden en el que los pacientes se infectaron o si hay varios casos índice [Nikolayevskyy 2016].

Entre sus ventajas destaca que es capaz de identificar variaciones estructurales complejas, como cambios en el número de copias y translocaciones cromosómicas. Además, puede detectar mutaciones en genes previamente no asociados a la enfermedad, incluso en regiones no codificantes. Sin embargo, cuenta con

limitaciones, como su coste (aunque cada vez es menor) y la necesidad de un software especializado en el análisis de datos.

4. CUADRO CLÍNICO

4.1. Tuberculosis pulmonar

Cualquier parte del cuerpo puede verse alterada por la tuberculosis, sin embargo, los pulmones son, habitualmente, los órganos más afectados (Tuberculosis pulmonar). En este tipo de tuberculosis, la tos es la manifestación respiratoria que más predomina, la cual puede ser seca o mucoide. Causada por el desarrollo de la necrosis del *caseum* y su licuefacción, esta tos puede ir acompañada de dolor torácico si hay lesiones en la laringe o los bronquios, e incluso, puede llegar a haber expectoración hemoptoica en el peor de los casos por lesiones en los vasos sanguíneos. El siguiente síntoma más frecuente es la fiebre, poco relevante al inicio de la enfermedad, pero importante en fases avanzadas de la tuberculosis pulmonar, llegando a ir acompañada de sudores nocturnos. Otro síntoma es la disnea o dificultad respiratoria, propia de fases avanzadas de la enfermedad por la presencia de zonas de fibrosis en los pulmones. Este hecho conlleva una menor funcionalidad de estos órganos: reducción de la capacidad ventilatoria, disminución del área superficial total de la membrana respiratoria, y una menor capacidad de difusión pulmonar de oxígeno y dióxido de carbono [Lyon 2017]. Para su diagnóstico, se recomienda cultivar los tres primeros esputos de la mañana.

En función del tiempo de latencia se describen dos formas de tuberculosis pulmonar: primaria, y posprimaria o del adulto. La tuberculosis primaria es aquella donde la enfermedad se desarrolla después de la infección, y es habitual en personas con el sistema inmunitario deprimido o debilitado (niños, infectados con el VIH o pacientes tratados con inmunosupresores), aunque se da cada vez más en adultos en países con baja prevalencia de tuberculosis. Los pacientes con tuberculosis primaria son más propensos a ser asintomáticos, o mínimamente sintomáticos. Pese a que la afectación parenquimatosa se puede dar en cualquier segmento del pulmón, hay una ligera predilección por los lóbulos superiores. Las lesiones cavitadas son poco frecuentes,

pero se pueden dar en casos de desnutrición severa. Es frecuente la inflamación de los ganglios linfáticos hiliares o paratraqueales, así como la aparición de adenopatías.

La tuberculosis secundaria (o posprimaria) se debe a una reactivación de una infección anterior que se ha mantenido hasta ahora en estado latente. Es la forma más frecuente y sintomática, afectando especialmente a los lóbulos superiores de los pulmones. La presencia de cavitaciones en una o varias lesiones fibrosas es característica en esta forma de tuberculosis, y se asocia a la diseminación por los bronquios.

4.2. Tuberculosis extrapulmonar

La tuberculosis puede afectar a otros órganos que no sean los pulmones, como resultado de una diseminación linfática o hematogena de los bacilos. Los síntomas varían según su localización, y aunque sus manifestaciones clínicas son más inespecíficas que en la tuberculosis pulmonar, los síntomas más frecuentes son la fiebre, malestar general y la pérdida de peso.

4.2.1. Tuberculosis ganglionar

Es la forma más frecuente de tuberculosis extrapulmonar. El cuadro clínico se caracteriza por la inflamación de los ganglios (especialmente los cervicales y supraclaviculares). En casos avanzados, los ganglios inflamados pueden resultar sensibles al tacto y la piel que los recubre se puede romper, causando una fístula. La muestra necesaria para el diagnóstico microbiológico se ha de obtener por punción del ganglio.

4.2.2. Tuberculosis pleural

Después de la afectación ganglionar, la tuberculosis pleural es la segunda forma más frecuente de tuberculosis extrapulmonar [Vorster 2015]. Esta forma está causada por la penetración de los bacilos en el espacio pleural, mostrando fiebre, dolor torácico y tos no productiva. En fases avanzadas de la infección, puede aparecer un empiema pleural, es decir, la acumulación de pus entre el espacio pleural y el pulmón. Aunque el rendimiento puede ser bajo, la muestra por elección para el diagnóstico es el esputo en primer lugar, y sino una biopsia de las lesiones del parénquima [Shaw 2018].

4.2.3. Tuberculosis miliar

También conocida como tuberculosis diseminada o hematológica, se trata de uno de los tipos de tuberculosis extrapulmonar más graves. Se produce por la rotura de un foco tuberculoso situado en un vaso sanguíneo, conllevando su posterior diseminación a través del torrente sanguíneo por todo el organismo. Se puede dar durante una infección primaria o después de una reactivación de un foco latente (tuberculosis secundaria). Cualquier sitio se puede ver afectado, no obstante, los pulmones y la médula ósea se ven comprometidos con mayor frecuencia. Las manifestaciones clínicas son muy variables, incluyendo debilidad muscular y malestar general, aunque la fiebre es el síntoma más habitual. Para el diagnóstico es útil emplear muestras respiratorias como el esputo, el broncoaspirado, lavado broncoalveolar, hemocultivo, muestras de la médula ósea o, en menor medida y si hay síntomas meníngeos, el líquido cefalorraquídeo. También puede resultar de ayuda emplear biopsias del hígado, pulmón y médula ósea.

4.2.4. Tuberculosis meníngea (o meningitis tuberculosa)

Tal y como se ha comentado anteriormente, *M. tuberculosis* complex se adquiere por inhalación, las micobacterias se multiplican dentro de los macrófagos alveolares y se diseminan a otros órganos que, en este caso, podrían ser las meninges. Ahí se forman granulomas meníngeos que pueden romperse hacia el espacio subaracnoideo y dar lugar a una meningitis. Los síntomas son algo inespecíficos, habiendo fiebre, cefalea, náuseas y somnolencia. El examen del líquido cefalorraquídeo permitirá diagnosticar esta enfermedad. En el caso de la tuberculosis meníngea, el líquido raquídeo presentará niveles elevados de proteínas, baja concentración de glucosa y un ligero aumento de los linfocitos. Estas alteraciones, sin embargo, no serían tan notorias como en una infección por otras bacterias.

4.2.5. Otras tuberculosis: osteoarticular, genitourinaria y peritoneal

La tuberculosis también puede afectar a los huesos y a las articulaciones. En concreto, está relacionada con los huesos de la muñeca, la mano y el codo, y con las articulaciones que soportan peso como las rodillas, la cadera y las de la columna. La alteración más frecuente es la enfermedad de Pott, una infección vertebral por micobacterias que se disemina a las vértebras próximas, produciendo un

estrechamiento del disco intervertebral y el consiguiente dolor y posible afectación funcional. El diagnóstico microbiológico se hace a partir de una biopsia o punción del absceso del hueso o articulación afectado.

Los síntomas de la tuberculosis genitourinaria son muy variados, aunque suele ser una pielonefritis que en el caso de los hombres se puede diseminar hasta la vejiga, la próstata, las vesículas seminales o el epidídimo; y en el caso de las mujeres alcanzar las trompas de Falopio y el endometrio. Debido a que, generalmente, una sola muestra de orina es negativa en pacientes con tuberculosis genitourinaria, para su diagnóstico se recomienda cultivar las tres primeras muestras de orina de la mañana.

La tuberculosis peritoneal es causada por bacilos que provienen de los ganglios linfáticos o diseminación hematológica, y que acaba infectando el peritoneo. La peritonitis es más frecuente en pacientes alcohólicos con cirrosis. Los síntomas relacionados son cansancio y dolor abdominal. La biopsia peritoneal, junto con una muestra de líquido ascítico puede ser de gran ayuda en el diagnóstico microbiológico de la enfermedad.

5. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN TUBERCULOSA

Como bien se ha indicado con anterioridad, la tuberculosis puede presentarse en los pacientes de manera activa, y por lo tanto causando la enfermedad, o bien, los bacilos permanecen en el organismo de la persona por un tiempo indeterminado sin que esta enferme (tuberculosis latente), pudiéndose convertir más adelante en la forma activa. Por ello, el diagnóstico precoz de la infección latente es de gran importancia para tratar de evitar que esta dé paso a la enfermedad. Hay dos tipos de pruebas que se usan para determinar si una persona está infectada con las bacterias de la tuberculosis: la prueba cutánea de la tuberculina y las pruebas de detección de la producción de interferón gamma.

5.1. Prueba cutánea de la tuberculina

Esta prueba (TST, por sus siglas en inglés), también conocida como test de Mantoux, se realiza para determinar si una persona está infectada con las bacterias de la tuberculosis, siendo un método importante para el cribado de la infección tuberculosa

latente. Este, se basa en la respuesta de hipersensibilidad retardada frente a determinados compuestos antigénicos específicos del bacilo. A pesar de ello, hay muchas micobacterias no tuberculosas que también los tienen, conllevando reacciones cruzadas (falsos positivos).

Se basa en la inyección intradérmica de la tuberculina al paciente, en la cara ventral del antebrazo. La tuberculina está constituida por un derivado proteico purificado (PPD), y en España la más utilizada es la RT-23 en dosis de 2 UT, con Tween 80, que es una de las recomendadas por la OMS [Cabriada 2000]. Este líquido provoca la aparición de un pequeño bulto pálido, una pápula, que desaparece a los pocos minutos. Al cabo de 48-72 h, el paciente regresa a la consulta médica para que le revisen la reacción de inmunidad celular midiendo con una regla el grado de hinchazón en el sitio de la inyección, y así ver si hay endurecimiento o no, puesto que el resultado de la prueba depende de esos factores (Figura 4). En España, se considera que un resultado es positivo si la induración tiene un tamaño de 5 mm o más, aunque dependerá del grupo de estudio (niños, inmunodeprimidos, VIH positivos, etc). En los pacientes vacunados con BCG se evaluará individualmente cada caso, sin olvidar que al aumentar el diámetro de la induración obtenida lo hace también la probabilidad de que la causa de la respuesta a la prueba de la tuberculina sea por infección tuberculosa, en especial si la induración supera los 15 mm. En pacientes afectados con el VIH, cualquier grado de induración tiene valor diagnóstico.



Figura 4. Revisión de la reacción de inmunidad celular en la prueba de la Tuberculina.

El test de Mantoux también presenta una serie de inconvenientes. En primer lugar, puede dar reacciones cruzadas con otras micobacterias porque la tuberculina contiene antígenos tuberculosos, muchos pertenecientes a *M. tuberculosis*, pero otros tantos están relacionados con *M. bovis-BCG*, a su vez presentes en la cepa vacunal de esta especie. Esto significa que aquellos pacientes previamente vacunados con BCG pueden dar positivo en la prueba de la tuberculina (baja especificidad). Por este motivo, en los vacunados el punto de corte para determinar un TST positivo será una induración de 15 mm o más. Además, se trata de una lectura subjetiva, y requiere de una segunda visita para evaluar el estado de la induración. Otro problema es la baja sensibilidad de la prueba en pacientes que están siendo tratados con inmunosupresores como en el caso de un trasplante de órganos o de pacientes infectados con el VIH, dónde se pueden dar falsos negativos al tener un sistema inmunitario debilitado, de modo que su respuesta de hipersensibilidad será menor, así como la reacción inflamatoria observada.

5.2. Técnicas *in vitro* basadas en la detección de IFN- γ

Estas pruebas se basan en la detección de interferón gamma liberado por las células T (linfocitos T) sensibilizadas presentes en sangre periférica que han sido estimuladas *in vitro* con antígenos específicos de *M. tuberculosis* complex.

En comparación con la tuberculina, estas técnicas basadas en la detección de IFN- γ son más sensibles y específicas. Las explicaciones a esto son la inclusión de controles para detectar falsos negativos, se pueden repetir al momento, sin necesidad de esperar las 48-72 h del test de Mantoux, y los antígenos que se emplean pertenecen al complejo *M. tuberculosis*, y están ausentes en la vacuna BCG y en la mayoría de las micobacterias ambientales. Este último hecho hace, entre otras cosas, que el IGRA discrimine mejor a los individuos sensibilizados por bacilos tuberculosos de aquellos vacunados por BCG.

Hay dos técnicas de IGRA comerciales en la actualidad. El primero de ellos es el QuantiFERON-TB Gold Plus, un test ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) de nueva generación que detecta y cuantifica el IFN- γ producido por los linfocitos T, directamente de sangre completa. En primer lugar, se extrae sangre del paciente, y se inocula en 4 tubos: 1) "Nulo", mide la producción basal de IFN- γ (hace el control

negativo); 2) “TB 1” y “TB 2”, contienen los antígenos ESAT-6 (*early secretory antigen target 6*) y CFP-10 (*culture filtrate protein 10*). El tubo 1 contiene péptidos sintéticos largos para estimular las células T CD4+, mientras que el tubo 2 contiene péptidos cortos para estimular las células T CD4+ y T CD8+; 3) “Mitógeno”, contiene fitohemaglutinina para estimular IFN- γ si el paciente se encuentra inmunodeprimido. Los tubos inoculados se incuban 16-24 h a 37°C, y tras extraer el suero, se cuantifica el IFN- γ mediante técnicas de ELISA o quimioluminiscencia. Los resultados se expresan automáticamente como positivo, negativo o indeterminado (si el control negativo supera cierto valor, o bien si el control positivo está por debajo de un determinado punto de corte).

La alternativa a esta técnica es el T-SPOT.TB, un test ELISPOT (*enzyme-linked immunosorbent-SPOT*) que cuantifica directamente el número de células T efectoras, las cuales producen IFN- γ . El procedimiento es parecido al del QuantiFERON-TB Gold Plus, pero tras tomar una muestra de sangre, se separan las células periféricas mononucleares (PBMC, *peripheral blood mononuclear cell*), y una vez recontadas, se depositan en una placa de 96 pocillos. A continuación, se sensibilizan con el control positivo de fitohemaglutinina y los antígenos ESAT-6 y CFP-10, incubándose durante 16-20 h a 37°C. Los resultados se expresan según el recuento de células productoras de IFN- γ .

Con todo, estas técnicas no discriminan, al igual que el TST, entre la tuberculosis latente y la tuberculosis activa, ni son capaces de predecir el riesgo de desarrollo a esta enfermedad tuberculosa [Barcellini 2016].

6. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

6.1. Muestras: Procesamiento, digestión y descontaminación

Existen muchos tipos de muestras, siendo las más frecuentes las de origen respiratorio (destacan el esputo, aspirado bronquial o traqueal, y el lavado broncoalveolar), dado que la tuberculosis pulmonar es la afección más usual. Pero también puede recogerse muestras como la orina, aspirados gástricos, biopsias, fluidos estériles como el líquido

cefalorraquídeo, y heces. Las muestras siempre se deben recoger en un envase estéril y correctamente identificadas. Las biopsias pueden ir acompañadas con un poco de suero salino para mantener su estabilidad. Hasta que se procesen, todas las muestras deberán mantenerse refrigeradas en la nevera a 4°C. El esputo espontáneo, inducido o expectorado, es la muestra idónea por su rendimiento y facilidad de obtención. Se debe recoger al menos una muestra durante tres días consecutivos, por la mañana y en ayunas, ya que la concentración de bacilos es mayor. Si el paciente es un niño y tiene dificultades a la hora de generar el esputo, se puede optar por obtener un aspirado gástrico para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar.

Otro punto importante es la eliminación de los restos orgánicos de las muestras. Este proceso se llama digestión, y permite la homogenización de la muestra, especialmente si es un esputo, cuando por ejemplo hay moco que no se licúa, ya que este puede proteger a otras bacterias contaminantes frente a los agentes descontaminantes. Aquellas muestras que no son estériles pueden presentar otros microorganismos, además de las micobacterias, que pueden ser contaminantes e interferir en el diagnóstico microbiológico. Por estos dos motivos, se utilizan métodos de digestión-descontaminación como los de Petroff (hidróxido de sodio), Tacquet y Tison (hidróxido de sodio y laurilsulfato de sodio), o el de Kubica (N-acetil-L-cisteína con hidróxido de sodio), siendo este último el más utilizado y recomendado para la mayoría de los sistemas de cultivo automáticos con medio líquido. Los líquidos estériles se procesan directamente, y las biopsias se tienen que disgregar y resuspender en 2 ml de solución salina antes de empezar con el protocolo de digestión-descontaminación.

6.2. Baciloscopia: observación microscópica

Una vez se tiene la muestra homogenizada y descontaminada, se procede a la observación al microscopio de las posibles micobacterias, una vez teñida la preparación. La observación microscópica de la muestra clínica es sencilla, proporciona una orientación diagnóstica de manera rápida, económica y permitiendo identificar a los pacientes más contagiosos en función de la cantidad de bacilos observados. A pesar de esto, debido a la baja sensibilidad de la baciloscopia, no se puede descartar que el paciente esté enfermo de tuberculosis si no se observan bacilos en la preparación. Por

ello, hay que confirmar el resultado con el cultivo que tiene una mayor sensibilidad (método de referencia para el diagnóstico de la enfermedad tuberculosa).

La visualización microscópica se puede hacer por varios métodos de tinción específica, basados en la propiedad de ácido-alcohol resistencia de las micobacterias. Las dos técnicas más empleadas son la tinción de Ziehl-Neelsen y la tinción de Auramina. Para la primera tinción, se utiliza la fucsina como colorante primario (las micobacterias se tiñen de rojo), se decolora con un ácido-alcohol, y se emplea azul de metileno como colorante de contraste. Por el contrario, en la tinción de Auramina se utilizan fluorocromos (colorantes que dan fluorescencia), de modo que mediante microscopia con luz ultravioleta se pueden observar las micobacterias teñidas de un color amarillo-verdoso. El tiempo de tinción entre ambas técnicas es parecido, y pese a que en la Auramina se necesitan menos aumentos en el microscopio por su mayor facilidad de detección (x250 frente a los x1.000 del Ziehl-Neelsen), en esta aparecen más artefactos que pueden dar lugar a falsos positivos. Por este motivo, la confirmación de la baciloscopia se deberá realizar mediante una tinción de Ziehl-Neelsen.

La morfología de *M. tuberculosis* complex en la microscopia es de bacilos delgados y alargados, pudiendo agruparse en paralelo y formando estructuras parecidas a “cuerdas” (*cord factor*) si la tinción se realiza a partir de un cultivo líquido positivo (Figura 5). La visualización de estas cuerdas o cordones es muy característica del crecimiento de *M. tuberculosis* complex, aunque no es patognomónica.



Figura 5. Visualización, mediante microscopia, de las cuerdas formadas por *M. tuberculosis* complex en una tinción de Ziehl-Neelsen (Por cortesía de Neus Vila Olmo).

A pesar de las ventajas ya mencionadas de la baciloscopia, como toda técnica, también presenta una serie de limitaciones. La más importante es su baja sensibilidad, oscilando entre el 22 y el 80% [Caulfield 2016], y que depende del tipo tinción empleada y de la carga bacilar presente en la muestra (las muestras de origen extrapulmonar contienen menos bacilos que las respiratorias).

6.4. Cultivo

El cultivo es considerado el método de referencia para el diagnóstico microbiológico de la tuberculosis. Esto se debe a varias razones, entre ellas su sensibilidad, la cual es muy superior a la de la microscopia. El cultivo permite detectar hasta 10 bacterias/ml en una muestra digerida y descontaminada [Yeager 1967]. Otra ventaja es que permite aislar el microorganismo para realizarle otras pruebas de identificación o sensibilidad a los fármacos antituberculosos, así como estudios posteriores de tipado, etc. En la actualidad se recomienda sembrar en un medio sólido y un medio líquido para incrementar la sensibilidad.

6.4.1. Medios sólidos

Los más utilizados son los que tienen base de huevo, para aportar lípidos, como el Löwenstein-Jensen (Figura 6), o con agar semisintético como el 7H10 y 7H11 de Middlebrook. Cualquiera de ellos requiere una atmósfera enriquecida con un 5-10% de CO₂, y una temperatura de 37°C de media, pudiendo variar según la muestra de cultivo y/o la micobacteria a aislar. Los cultivos micobacterianos requieren un mínimo de 6 semanas de incubación para darlos definitivamente como negativos, a pesar de que existen algunas especies micobacterianas que requieren un periodo mayor.

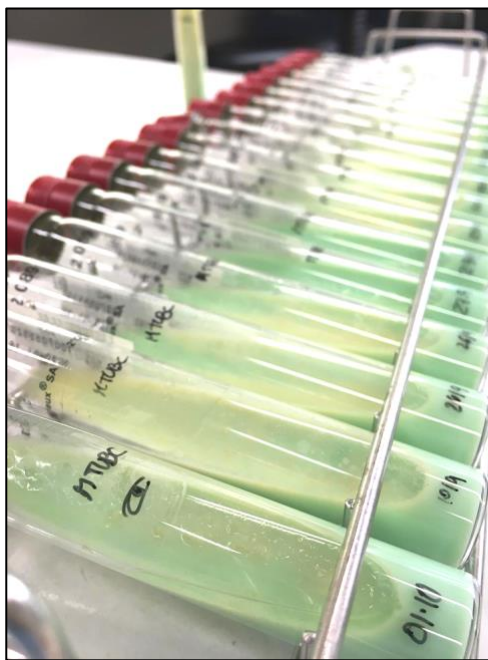


Figura 6. Tubos de Löwenstein-Jensen con cultivo positivo para *Mycobacterium tuberculosis* complex.

El medio de Löwenstein-Jensen es un medio selectivo por la presencia de verde de malaquita y sales minerales, que además de otorgarle un color característico al medio sólido, inhiben el crecimiento de la mayoría de los organismos contaminantes.

6.4.2. Medios líquidos

La principal ventaja que aportan los medios líquidos es que se favorece más el crecimiento microbiológico, obteniendo un resultado de cultivo positivo en menor tiempo que los medios sólidos. A pesar de ello, se contaminan con más facilidad y puede ser difícil valorar si hay crecimiento o no. Por este motivo se utilizan

INTRODUCCIÓN

complementos con una mezcla de determinados agentes antimicrobianos y fungicidas que intentar minimizar la contaminación. Muchos de estos medios líquidos se utilizan en sistemas de incubación y lectura semiautomáticos como el BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, EEUU), el MB/BacT ALERT 3D (BioMérieux, Francia) y el VersaTrek (TREK Diagnostics, EEUU), los cuales se muestran en la Figura 7 y 8. El primero de ellos detecta el crecimiento micobacteriano mediante sensores fluorescentes sensibles al oxígeno que se consume. El segundo de ellos detecta por cambios de pH la producción de CO₂, y el tercero detecta cambios de presión ante el consumo de oxígeno.



Figura 7. Métodos basados en el cultivo de medios líquidos para la realización de las pruebas de sensibilidad indirectas de *M. tuberculosis* complex: Bactec MGIT 960 (izquierda), MB/BacT ALERT 3D (centro) y VersaTrek (derecha).

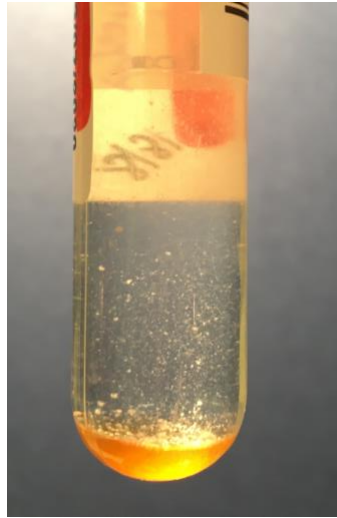


Figura 8. Tubo de MGIT con crecimiento positivo para *M. tuberculosis* complex.

En cuanto al medio líquido más empleado, este es el 7H9 de Middlebrook, generalmente acompañado con suplementos de enriquecimiento como el OADC y antibióticos para inhibir la microbiota acompañante, como se ha comentado.

6.5. Identificación

Una vez el cultivo sólido y/o líquido ha dado positivo, es necesario realizar pruebas que permitan identificar el microorganismo, para determinar si se trata de una micobacteria (puede ser *M. tuberculosis* complex o una MNT) o no. La mayoría de las técnicas disponibles se basan en características fenotípicas, bioquímicas, inmunocromatográficas, proteómicas y moleculares.

6.5.1. Fenotípica

Entre las características fenotípicas, destaca su velocidad de crecimiento en medios de cultivo sólidos, más lenta que la de otras bacterias (su tiempo de división es de unas 18 h), lo cual conlleva que en este tipo de medios se tarden varias semanas en poder detectar colonias visibles, mientras que su crecimiento en medios líquidos se da en un tiempo inferior. El crecimiento de *M. tuberculosis* es óptimo a 35°C-37°C y con una atmósfera enriquecida con CO₂. Las colonias de *M. tuberculosis* complex presentan una

morfología muy característica, de color crema, rugosas, como si fueran “migas de pan o en forma de coliflor” y no cromógenas.

6.5.2. Bioquímica

Existen diversas pruebas bioquímicas que permiten identificar *M. tuberculosis*. Entre las más importantes, destaca la prueba de la niacina, la reducción de nitratos y la prueba de la catalasa. Sin embargo, estas pruebas están en desuso debido a que existen técnicas de detección más rápidas como las técnicas inmunocromatográficas (detección del antígeno específico de *M. tuberculosis* MPT64), además de técnicas moleculares que permiten estudiar la sensibilidad a los fármacos antituberculosos tanto de primera como de segunda línea mediante la utilización de sistemas automatizados en medio líquido.

6.5.3. Inmunocromatográfica

Los métodos de identificación inmunocromatográficos actuales se fundamentan en la detección del antígeno MPT64, una proteína secretada por la mayoría de las especies que conforman el complejo *M. tuberculosis*. Las técnicas comerciales disponibles emplean una reacción de anticuerpos monoclonales anti-MPT64 contra el antígeno MPT64.

Al dispositivo de ensayo se le añade un determinado volumen del cultivo líquido o suspensión del cultivo sólido positivo en el pocillo de muestras que contiene una tira de nitrocelulosa con los anticuerpos anti-MPT64 inmovilizados. Entre sus ventajas destaca su rapidez (en 15 min se pueden empezar a apreciar la positividad de las bandas), además de tratarse de un método sencillo y económico, con una gran sensibilidad y excelente especificidad. Tan solo existen algunas subcepas de *M. bovis* BCG que no secretan esta proteína [Yamaguchi 1989].

6.5.4. Proteómica

En la rutina diaria de los laboratorios, cada vez es más frecuente emplear el sistema Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) para la identificación rápida de bacterias y levaduras [Claydon 1996]. Esta técnica permite identificar micobacterias mediante el análisis del perfil o espectro proteómico obtenido tras el procesamiento de la muestra [Pignone 2006], empleando un rayo

láser (nitrógeno) para analizar moléculas orgánicas. El espectro de masas generado se compara, mediante un programa informático especializado, con los perfiles obtenidos para los diferentes géneros y especies, permitiendo la identificación del microorganismo. Entre sus ventajas destaca la rapidez de lectura e identificación.

6.5.5. Molecular

Los métodos moleculares desarrollados en los últimos años han supuesto un importante avance en el diagnóstico rápido de las enfermedades infecciosas como la tuberculosis. Su utilidad ha sido ampliamente evaluada y existen guías para su uso en rutina. Estas técnicas ofrecen varias ventajas frente a los métodos de detección convencionales (cultivo), entre las cuales destaca un menor tiempo de respuesta, permitiendo adelantar el diagnóstico de varias semanas a unas pocas horas. Además, los procedimientos de extracción y amplificación, así como los reactivos, de estas técnicas son más sensibles que aquellos de las técnicas de identificación en cultivo, debido a que la concentración bacilar en muestra clínica es mucho menor que cuando se trabaja a partir de cultivo. En la actualidad, la mayoría de estas técnicas mantienen una buena relación coste- beneficio, siendo de gran utilidad en los casos de alta sospecha clínica. Aunque existen sistemas caseros y sistemas comerciales, estos últimos están estandarizados y son los recomendados por los organismos internacionales.

6.5.5.1. Amplificación de ácidos nucleicos (NAA)

Se fundamentan en amplificar una determinada región (normalmente por PCR) del genoma bacteriano para poder analizarlo posteriormente. Dentro de esta metodología, destacan técnicas como la PCR-RFLP, la hibridación en fase sólida, los *microarrays*, la secuenciación, y la PCR a tiempo real.

6.5.5.1.1. PCR-RFLP del *hsp65* (PRA)

Uno de los genes que se pueden amplificar para detectar *M. tuberculosis* complex es el gen *hsp65*. A esta técnica genotípica, conocida como PCR-RFLP (PRA), se le realiza una digestión enzimática del producto amplificado mediante *BstEII* y *HaeIII*, y por electroforesis se observará un patrón de bandas característico según la especie o subespecie. De este modo, *M. tuberculosis* presenta un patrón de PRA diferente al

resto de micobacterias, el 235/120/85 con *Bst*El y 150/130/70 con *Hae*III [Telenti 1993]. A pesar de ser una técnica rápida y sencilla, su sensibilidad de amplificación para *M. tuberculosis* complex es baja.

6.5.5.1.2. Pruebas de hibridación en fase sólida

En estas pruebas moleculares, el producto de la PCR se desnaturaliza y se hibrida con unas sondas cortas (20 nucleótidos, aproximadamente) marcadas e inmovilizadas en una membrana de nitrocelulosa. Este soporte sólido puede ser una tira de nitrocelulosa, o bien un *microarrays* o *chips* de ADN, entre otros dispositivos.

Existen diversos sistemas comerciales que emplean las tiras de nitrocelulosa, entre los más destacados hay el INNO-LiPA (Innogenetics, Ghent, Belgium) y el GenoType *Mycobacterium* (Hain Lifescience, Nehren, Germany). La diferencia entre ellos es la diana dónde actúan, siendo el espacio intergénico 16S-23S en el caso del INNO-LiPA, y el 23S en el del GenoType. En ambos casos estos sistemas permiten identificar varias especies dentro del género micobacteriano, ya sean MNT comúnmente aisladas o varias especies dentro del complejo *M. tuberculosis*. Desde su aparición, fueron obteniendo mayor relevancia y se emplearon cada vez más, en especial el GenoType *Mycobacterium* CM y el MTBC.

6.5.5.1.3. Secuenciación del ADNr 16S

Otro ejemplo de NAA es la secuenciación del ADNr 16S o de la región intergénica del 23S, considerada la amplificación de ADN convencional mediante PCR. Una vez se tiene el producto amplificado, y con la ayuda de un secuenciador, se introduce la secuencia en una base de datos global (GenBank, o RIDOM 16S rDNA, por ejemplo) que determinará de qué especie se trata por el grado de similitud obtenido. Por estos motivos, esta técnica es laboriosa, además de necesitar contar con un secuenciador (el cual es costoso) y personal cualificado.

No obstante, además del uso de estas técnicas, también se están desarrollando nuevas metodologías que permitan reducir costes, tiempo de respuesta y aporten sencillez, con el fin de poder realizar lo que se ha denominado como “secuenciación masiva”. Dentro de ellas, las más comunes son la pirosecuenciación, secuenciación *SOLiD*, el *Ion Torrent Sequencing* e *Illumina Sequencing*. En la primera de ellas, la pirosecuenciación, se detecta la luz que emite la luciferasa después de liberar pirofosfato en la síntesis del

ADN [Arnold 2005], sin embargo, en la actualidad está prácticamente en desuso por su elevado precio. En el caso de la secuenciación *SOLiD*, se realiza una secuenciación por ligación de oligonucleótidos. A pesar de su gran precisión, hoy en día se utiliza poco debido a que genera secuencias de lectura muy cortas, además de que las secuencias palindrómicas impiden una correcta secuenciación [Huang 2012]. En la tercera de ellas, el *Ion Torrent Sequencing*, se realiza una secuenciación mediante un ion semiconductor. De esta manera, cuando se incorpora un nuevo nucleótido a la cadena durante la síntesis, se libera un protón que altera el pH, detectando la incorporación del mismo. El último caso mencionado es *Illumina*, fundamentada en el uso de nucleótidos marcados con fluoróforos que bloquean de forma reversible la elongación de la cadena. También se le conoce como secuenciación por síntesis, y es la tecnología de secuenciación más utilizada en la actualidad [Comas 2016]. Entre las ventajas del *Ion Torrent Sequencing* y de *Illumina* destacan su bajo coste una vez implementado y que permite realizar lecturas largas, pero requieren de una importante inversión inicial y un correcto mantenimiento, motivos por los cuales no se usan en el día a día para identificar *M. tuberculosis* complex. Aparte de estas dianas, también se emplean otras para amplificar ácidos nucleicos, como el *IS6110*, *rpoB*, *dnaj*, *sodA*, y *recA*. Las dos primeras son las más relevantes de las mencionadas anteriormente, en especial la *IS6110*, que fue una de las primeras dianas en ser comparadas con cultivo para demostrar su utilidad como prueba diagnóstica. A pesar de una notable sensibilidad y una excelente especificidad, varios estudios encontraron problemas que pueden afectar de una forma muy importante a este tipo de pruebas, como la presencia de ADN contaminante, amplificación no específica de la muestra o la presencia de inhibidores que neutralizan a las polimerasas e invalidan el resultado de las pruebas.

6.5.5.2. Pruebas de PCR a tiempo real

El fundamento de estas técnicas es el de amplificar e hibridar simultáneamente el producto de la amplificación del ADN con sondas marcadas con fluorescencia. De este modo, el termociclador detectará la fluorescencia emitida por el fluorocromo excitado en función del ADN presente en la reacción, y se mostrará en un gráfico a tiempo real.

El método más conocido, por el respaldo de la OMS desde 2010, es el sistema GeneXpert (Cepheid, Sunnyvale, USA). Su ensayo Xpert MTB/RIF se emplea para la

detección de *M. tuberculosis* complex de muestra directa, así como para saber si hay resistencia a la Rifampicina [WHO Xpert 2013]. La muestra se trata con un reactivo durante 15 min y se introduce en un cartucho que contiene todos los reactivos necesarios para la extracción del ADN y la amplificación a tiempo real dentro del sistema GeneXpert. El resultado se obtiene en menos de dos horas, indicando si es positivo o negativo para la presencia de *M. tuberculosis* complex en la muestra, además de otorgarle una categoría semicuantitativa en base a la carga bacilar presente (“*Very Low, Low, Medium, o High*”), y en caso de ser positiva si hay resistencia a la Rifampicina o no (“*RIF resistance detected or not detected*”). El ensayo contiene, además, unas esporas de *Bacillus globii*, las cuales son procesadas por el sistema, que extrae el ADN, lo amplifica e hibrida con unos *primers* y sonda específicos (control positivo). En caso de no lograrse la extracción y/o amplificación de este control, el resultado que da la técnica no es válido (*Invalid*). Además de su sencillez y rapidez (el tiempo de respuesta del Xpert MTB/RIF es de dos horas, con tan sólo dos minutos de procesamiento manual), destaca por su alta sensibilidad y especificidad en relación a la detección de material genético micobacteriano (89% y 99%, respectivamente), así como su elevada sensibilidad y especificidad en cuanto a la detección de la resistencia a la Rifampicina (95% y 98%, respectivamente) en casos con tuberculosis pulmonar [Steingart 2014]. Sin embargo, estos porcentajes se ven disminuidos en las muestras de origen extrapulmonar, las cuales contienen una menor carga bacilar. Por estos motivos, recientemente apareció una actualización del cartucho utilizado, llamado Xpert MTB/RIF Ultra. Este nuevo cartucho, también recomendado por la OMS [WHO Tuberculosis Report 2019], contiene una serie de mejoras para tratar de incrementar la sensibilidad en las muestras paucibacilares, como por ejemplo una nueva categoría de detección (“*Trace*”), una cámara dónde se realiza la PCR con mayor capacidad, la detección de mutaciones mediante el análisis de curvas de *melting*, dos nuevas dianas (las secuencias de inserción IS1081 e IS6110), y los resultados se obtienen en un tiempo menor (<80 min).

Como alternativa a esta técnica, existen múltiples métodos como el Anyplex (Seegene Inc., Korea), basado en la detección del ADN micobacteriano amplificado en cada ciclo mediante el uso de oligonucleótidos marcados. En este caso también se obtienen los

resultados en menos de 2 horas, y permite detectar tanto material genético de *M. tuberculosis* complex como de MNT. De manera complementaria, existen otros test para detectar la resistencia a los principales fármacos antituberculosos de primera y segunda línea (Anyplex II MTB/MDR/XDR), útil en casos con multirresistencia.

Otro de los métodos de PCR a tiempo real para detectar tuberculosis es el FluoroType MTB (HainLifescience, Germany). En este caso se emplean unas sondas llamadas *Hybeacon*, que al unirse al producto amplificado generan fluorescencia. Permite detectar la resistencia a la Isoniacida y a la Rifampicina. No obstante, en comparación con el método recomendado por los organismos internacionales (GeneXpert), el Fluorotype tarda más (resultados en 3-4 horas, y no en menos de dos horas), además de haber pocos estudios con muchas muestras que evalúen la sensibilidad y especificidad de la técnica [Hillemann 2018].

7. FÁRMACOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA

En el tratamiento de la tuberculosis se deben cumplir dos objetivos: asociar fármacos para evitar la selección de resistencias y prolongar el tratamiento el tiempo necesario para asegurar la curación y evitar recaídas. Por ello, se recomienda que todo tratamiento asocie al menos cuatro fármacos no utilizados previamente, o que haya certeza de que *M. tuberculosis* complex es sensible a los mismos. De esos cuatro, al menos dos de ellos deben ser fármacos “esenciales”, que son los que eliminan la mayor parte de la población bacilar y pueden curar al paciente. Y dentro de estos medicamentos “esenciales”, al menos uno debe tener buena actividad bactericida (capacidad de destruir los bacilos activos, es decir, los que se encuentran en fase de multiplicación rápida, que están en las lesiones cavitadas y que son los que producen los síntomas y la transmisión), y al menos otro debe tener una buena capacidad esterilizante (capacidad de eliminar los bacilos en fases semilatóentes productores de las recaídas). Los otros dos fármacos son los que se denominan “acompañantes” y que tienen se encargan de proteger a los fármacos “esenciales” de la selección de resistencias [Caminero 2017].

INTRODUCCIÓN

Entre los fármacos con más acción bactericida, destaca la Isoniacida, seguida de la Rifampicina, Estreptomina y Pirazinamida. En cuanto a la acción esterilizante, esta hace referencia a la capacidad para eliminar los bacilos que permanecen en estado latente, siendo la Rifampicina, la Pirazinamida, y en menor medida la Isoniacida, los fármacos con un mayor poder esterilizante.

Por estos motivos, el uso simultáneo de diversos fármacos es esencial para el tratamiento de la tuberculosis. Hasta hace pocos años, la OMS clasificaba estos fármacos en grupos (Grupo 1, 2, 3, 4, y 5) [WHO Guidelines 2011]. Sin embargo, recientemente se actualizó esta clasificación para dividirlos en fármacos antituberculosos de primera línea, y fármacos antituberculosos de segunda línea (Tabla 1) [WHO Guidelines 2016].

Tabla 1. Clasificación de los fármacos antituberculosos (adaptado de la OMS) [WHO Guidelines 2016].

Fármacos antituberculosos de primera línea		
Fármacos orales		Isoniacida Rifampicina Etambutol (acompañante) Pirazinamida
Fármacos antituberculosos de segunda línea		
Grupo A: Fluoroquinolonas		Levofloxacino Moxifloxacino Gatifloxacino Ofloxacino
Grupo B: Inyectables	Aminoglucósidos	Estreptomina Kanamicina Amikacina
	Polipéptidos	Capreomicina
Grupo C: Otros	Tionamidas	Etionamida Protionamida
		Cicloserina Linezolid Clofazimina
Grupo D: Fármacos complementarios con poca experiencia demostrada		Bedaquilina Delamanid

7.1. Fármacos de primera línea

7.1.1. Isoniacida

La Isoniacida, sintetizada y empleada desde 1952, es uno de los medicamentos más importantes para combatir la tuberculosis [Zumla 2013], inhibiendo la síntesis de ácidos micólicos, esenciales para la formación de la pared bacteriana. Para ello, este profármaco se activa in vivo mediante la enzima catalasa-peroxidasa codificada por el gen *katG* de la micobacteria. Una vez ya se ha obtenido la forma activa (ácido isonicotínico), reacciona con la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) formando aductos de INH-NAD, los cuales inhiben las enzimas *inhA* y dihidrofolato reductasa (DHFR) que intervienen en la síntesis de los ácidos micólicos de la pared bacteriana [Zhang Y 2015; Banerjee 1994]. La Isoniacida tiene un efecto bactericida cuando la micobacteria se replica a nivel extracelular, donde el pH es neutro o ligeramente alcalino. Además, también tiene un efecto bacteriostático a nivel intracelular cuando la micobacteria se encuentra en fase de crecimiento lento, donde el pH es ácido, tal y como sucede en las lesiones caseosas.

La frecuencia de resistencias a la Isoniacida es elevada (un bacilo con mutaciones resistentes en 10^5 - 10^6 bacilos) [Caminero 2013]. La mayoría (68-90%) de las resistencias observadas a la Isoniacida se deben a mutaciones en dos genes: el gen *katG*, y el gen *inhA* y/o su zona promotora. El primero de ellos, el gen *katG*, interviene en la transformación de la Isoniacida en un compuesto activo, y la mutación más habitual (50-93%) en este gen es la sustitución aminoacídica S315T (AGC pasa a ser ACC o ACA) [Zhang 2015]. Las mutaciones en este gen se relacionan con altos niveles de resistencia (Concentración Inhibitoria Mínima; CIM >1 mg/L), además de presentarse con más frecuencia en casos con multirresistencia a la tuberculosis y no tanto en los de monorresistencia [Hazbón 2006]. Por el contrario, el gen *inhA* codifica la enoil-ACP reductasa que interviene en la síntesis de la pared bacteriana. Las mutaciones en *inhA* son menos frecuentes que en el gen *katG* (hasta un 40% y hasta un 70%, respectivamente), y se correlacionan con resistencias de bajo nivel a la Isoniacida [Banerjee 1994], además de darse con mayor frecuencia en casos con monorresistencia. Las posiciones de la región promotora -8 (T por C o A), -15 (C por T) y -16 (A por G) son las más afectadas. Es importante remarcar el hecho de que la

resistencia al gen *inhA* y/o su región promotora provoca resistencia cruzada a la Etionamida [Zhang Y 2015]. Ambos fármacos son profármacos activados por la catalasa-peroxidasa de la micobacteria, codificada por el gen *katG*, y actúan inhibiendo la actividad de la enzima enoil-ACP-reductasa, responsable de la síntesis del ácido micólico de la pared celular. Por lo tanto, las mutaciones en la región promotora *inhA*, conllevan a una resistencia cruzada entre la Etionamida e Isoniacida.

Otras dianas que pueden verse mutadas son: a) la región promotora del *ahpC*, que codifica para una alquil hidroperóxido reductasa y se correlaciona con bajos niveles de resistencia a la isoniacida; b) el gen *kasA*, que codifica para la beta-cetoacil-ACP sintasa, y; c) el gen *mshA*, que codifica la enzima glicosil transferasa [Jagielski 2015].

7.1.2. Rifampicina

La Rifampicina, sintetizada en 1963 [Zumla 2013], es otro de los fármacos más efectivos contra la tuberculosis, por su acción bactericida a nivel extracelular y su acción esterilizante. Su mecanismo de acción de basa en su unión a la subunidad beta de la ADN polimerasa, inhibiendo la síntesis de ARNm [Zhang Y 2015]. Al ser un potente inductor hepático enzimático, y por lo tanto acelerar el metabolismo de otros fármacos, la Rifampicina suele ser substituida por otras rifamicinas, como la Rifabutina en pacientes con tuberculosis e infección con el VIH [CDC 2000] o la Rifapentina.

La frecuencia de resistencias a la Rifampicina es de un bacilo por cada 10^7 - 10^8 bacilos. El gen *rpoB* es la principal diana dónde se concentran la mayoría (más del 95%) de mutaciones asociadas a la resistencia fenotípica de la Rifampicina [Telenti-Lancet 1993]. Concretamente, las mutaciones suceden en una región de 81 pb del gen *rpoB*, abarcando desde el codón 507 al 533. Las alteraciones más frecuentes son S531L (TCG por TTG), H526Y/D (CAC por TAC/GAC), y D516V (CAG por GTC) [Telenti-Lancet 1993], y en menor medida las mutaciones relacionadas con los codones 516, 518, 522, 529 y 533. La mayoría de estas mutaciones se relacionan con altos niveles de resistencia a la Rifampicina. Si bien es cierto que existen otras rifamicinas, el mecanismo de acción y los mecanismos de resistencia son idénticos a los de la Rifampicina, con lo que generalmente existe resistencia cruzada. Así, las resistencias de alto nivel suelen afectar a todas las rifamicinas, mientras que las cepas con resistencias de bajo nivel a la Rifampicina, pueden ser sensibles a la Rifapentina y a la Rifabutina.

Es muy importante destacar que una gran parte de cepas resistentes a la Rifampicina, también lo son a la Isoniacida, de modo que el hecho de detectar mutaciones en *rpoB* puede ser de gran utilidad para detectar MDR-TB, empleando el *rpoB* como marcador de multirresistencia [Telenti-Lancet 1993; Alcaide 2011].

7.1.3. Etambutol

El Etambutol fue sintetizada en 1961 [Thomas 1961; Zumla 2013], y su mecanismo de acción de fundamenta en la inhibición de la arabinosil transferasa, una enzima fundamental para la síntesis del arabinogalactano y lipoarabinogalactano, componentes de la pared celular de *M. tuberculosis* complex. A pesar de que su acción bacteriostática es baja tanto a nivel extracelular como a nivel intracelular, se utiliza como uno de los fármacos “acompañantes” que componen la terapia antituberculosa porque reduce la probabilidad de aparición de resistencias a la Isoniacida y a la Rifampicina [Caminero 2013].

La frecuencia de resistencias al Etambutol es de 1 bacilo por cada 10^5 - 10^6 bacilos. El mecanismo de resistencia está relacionado con el operón *embCAB* y, aunque se han descrito diversas mutaciones en el operón *emb* en relación a la resistencia adquirida al etambutol en *M. tuberculosis* complex, la mayoría se localizan en el gen *embB* [Telenti 1997], sobre todo en el codón 306 (dónde destacan M306V y M306I), seguido del 406, que explicarían ambos el 60-80% de todas las resistencias fenotípicas a este fármaco [Alcaide 1997; Moure 2014]. También se han encontrado otras mutaciones en los genes *embC* y *embA*.

7.1.4. Pirazinamida

La Pirazinamida, sintetizada en 1952, es un profármaco que mediante la acción de la pirazinamidasa se transforma en su forma activa, el ácido pirazinoico [Kushner 1952; McDermott 1954]. Su mecanismo de acción no es del todo conocido, pero sí se sabe que depende del pH. La Pirazinamida, en pH ácido, tiene bajas propiedades bactericidas, pero dispone de un gran poder esterilizante, sobre todo en aquellos bacilos intracelulares que no se encuentran en crecimiento. [Caminero 2013].

El principal mecanismo de resistencia a la Pirazinamida son las mutaciones que afectan a la región estructural del gen *pncA* (asociado en el 72-97% de las cepas de *M.*

tuberculosis resistentes), que codifica para la pirazinamidasasa [Scorpio 1996]. Las mutaciones en este gen son muy frecuentes, en 1 bacilo de cada 10^2 - 10^4 bacilos, y la mayoría de ellas suceden en 3 zonas (3-17, 61-85 y 132-142). Es importante remarcar el hecho que tanto *M. bovis*, como *M. bovis-BCG*, son intrínsecamente resistentes a la Pirazinamida, a causa de una mutación puntual en el codón 169 en el gen *pncA*.

7.2. Fármacos de segunda línea

7.2.1. Fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas actúan inhibiendo la ADN girasa, enzima codificada por los genes *gyrA* y *gyrB*, de modo que se impide la replicación del ADN [Takiff 1994]. Por este motivo presentan actividad bactericida, además de tener capacidad esterilizante. Existen diferentes tipos de fluoroquinolonas que son eficaces contra *M. tuberculosis* complex, siendo el Levofloxacino, Moxifloxacino, Gatifloxacino y Ofloxacino las más utilizadas.

La frecuencia de resistencias a las fluoroquinolonas es de 1 de cada 10^5 - 10^6 bacilos [Takiff 1994]. La mayoría de las mutaciones se encuentran en una región denominada QRDR (*quinolone resistance determining region*), que comprende los genes *gyrA* y *gyrB*. Son más frecuentes la aparición de resistencias en el gen *gyrA* (casi el 85% de las veces), el cual codifica por la subunidad α de la ADN girasa, y se correlacionan con resistencias fenotípicas de alto nivel. En concreto, las mutaciones más habituales en este gen son D94G/A/N/Y/H (GAC por GGC/GCC/AAC/TAC/CAC), A90V (GCG por GTC), y S91P (TCG por CCG) [Li 2014]. Por otro lado, la frecuencia de aparición de resistencias en el gen *gyrB*, que codifica para la subunidad β de la ADN girasa, es menor, casi el 10% de las veces [Zhang Y 2015]. El polimorfismo en este grupo de fármacos puede conllevar falsos positivos o falsos negativos. Algunos estudios han reportado polimorfismo en la zona QRDR del gen *gyrA* sensibles a las fluoroquinolonas, así como polimorfismos fuera del QRDR que también podrían predisponer potencialmente a la resistencia a estos fármacos [Devasia 2012]. Aunque se han hallado excepciones, se ha constatado resistencia cruzada entre las diferentes fluoroquinolonas.

7.2.2. Inyectables de segunda línea

En este grupo se encuentran aminoglucósidos como la Estreptomina (descubierta en 1944), Kanamicina (descubierta en 1957) y la Amikacina (desarrollada en 1972), así como polipéptidos cíclicos como la Capreomicina (descubierta en 1963) [Zumla 2013].

Los aminoglucósidos actúan inhibiendo la síntesis de proteínas mediante su unión irreversible a la subunidad 30S del ribosoma. Esta unión provoca una lectura errónea del ARNm que conlleva un aumento del número de proteínas mal traducidas, y el consecuente efecto bactericida [Zhang Y 2015]. Tradicionalmente, se ha incluido a la Estreptomina dentro de los fármacos antituberculosos de primera línea, sin embargo, no se incluye en la terapia estándar inicial debido sus efectos adversos (ototoxicidad y alteraciones renales), su elevada tasa de resistencia, y a que no se administra por vía oral, tal y como sí sucede con la Isoniacida, Rifampicina, Etambutol y Pirazinamida. La Capreomicina, obtenida a partir de *Streptomyces capreolus*, presenta un mecanismo de acción similar a los aminoglucósidos, inhibiendo la síntesis de proteínas mediante la inhibición de la peptidil-ARNt, y teniendo también un efecto bactericida [Zierski 1969].

La aparición de resistencia a la Estreptomina es habitual, dándose en 1 de cada 10^5 - 10^6 bacilos. Esta resistencia suele estar relacionada con mutaciones en el gen *rpsL*, que codifica la proteína ribosomal S12 y se asocia a altos niveles de resistencia. La mayoría de estas mutaciones suceden en el codón 43 (K43R) y en el codón 88 (K88Q/R). También se puede ver afectado el gen *rrs*, que codifica el 16S ARNr, y se asocia con niveles intermedios-bajos de resistencia. En este gen, las mutaciones más comunes se encuentran en la región 530 y en la región 912 [Zhang Y 2015].

Algunos estudios han sugerido la presencia de resistencia cruzada entre los otros tres inyectables de segunda línea: Kanamicina, Amikacina y Capreomicina. En estos casos, las mutaciones se hallan principalmente en el gen *rrs*: A1401G (relacionada con altos niveles de resistencia a la Kanamicina y a la Amikacina), C1402T (relacionada con altos niveles de resistencia a la Capreomicina), y G1484C/T (relacionada con altos niveles de resistencia a estos tres inyectables de segunda línea) [Zhang Y 2015; Suzuki 1998]. También se han encontrado mutaciones en la región promotora del gen *eis* (G-37T, C-14T, C-12T, y G-10A), que codifica una aminoglicosil transferasa, y se asocia a bajos niveles de resistencia a la Kanamicina y a la Amikacina [Zaunbrecher 2009].

7.3. Otros fármacos antituberculosos

7.3.1. Etionamida

La Etionamida (ETO), sintetizada en 1956 [Zhang Y 2015], forma parte de las tionamidas, que a su vez derivan del ácido isonicotínico. Se trata de un profármaco que se activa mediante la monooxigenasa EtaA/EthA, para acabar inhibiendo la síntesis de ácidos micólicos de la pared celular (acción bactericida). Otra tionamida muy empleada contra la tuberculosis es la Protionamida (PTO), con estructura y actividad casi idéntica a la de ETO. Al tener una misma diana, la INH, ETO y PTO presentan resistencia cruzada entre sí, de modo que mutaciones en el gen *inhA* de la INH conferirán resistencia a ETO [Vilchèze 2014].

7.3.2. Cicloserina

La Cicloserina, descubierta en 1955, parece ser que en *M. tuberculosis* actúa como agente bacteriostático bloqueando la acción de enzimas que intervienen en la síntesis del peptidoglicano de la pared celular bacteriana [Zumla 2013]. Este fármaco se utiliza solo en MDR-TB, y sus mecanismos de resistencia no son del todo conocidos.

7.3.3. Linezolid

El Linezolid, antibiótico sintetizado en 1996, es una oxazolidona muy utilizada para las bacterias gram positivas, aunque no fue hasta el año 2000 cuando también se empezó a utilizar para el tratamiento de la tuberculosis multirresistente [Migliori 2009]. Este fármaco actúa como bacteriostático, e inhibe la síntesis de proteínas uniéndose a la peptidil transferasa de la subunidad 50S del ribosoma [Zhang Y 2015].

Las mutaciones más frecuentes para este medicamento suceden en el gen *rrl*, que codifica para el 23S ARNr, y en el gen *rplC*, que codifica por la proteína ribosomal L3. Sin embargo, solo un 30% de las mutaciones están relacionadas con estos dos genes en los casos con tuberculosis multirresistente [Pi 2019].

7.3.4. Clofazimina

La Clofazimina (CFZ), desarrollada por un equipo científico en 1954, presenta un mecanismo de acción complejo que desemboca en una reducción de la producción de ATP [Barry 1957]. Tiene acción bactericida a nivel intracelular y a nivel extracelular.

Se han descrito mutaciones en *rv0678* (la cual también genera resistencia para la Bedaquilina), *rv1979c* y en *rv2535* [Zhang S 2015].

7.3.5. Bedaquilina

La Bedaquilina, sintetizada en 2005, es un fármaco que solo se emplea para el tratamiento de la tuberculosis multirresistente [Pym 2016]. Es una diarilquinolina que actúa sobre la cadena de transferencia de protones, alterando la actividad metabólica de la ATP sintasa específica de las micobacterias (efecto bactericida).

Las resistencias a este antimicrobiano se han asociado a mutaciones en el gen *mmpR* (*rv0678*), relacionado con altos niveles de resistencia [Zimenkov 2017].

7.3.6. Delamanid

Desarrollado en 2006, el Delamanid es un nitro-dihidro-imidazoxazol autorizado para el tratamiento de tuberculosis multirresistente, tal y como sucede con la Bedaquilina. Este profármaco requiere de una nitroreductasa para ser activo, y a continuación inhibir los ácidos micólicos [Zhang Y 2015]. Tiene capacidad esterilizante, actuando sobre las formas no replicativas de *M. tuberculosis* complex [Szumowski 2015].

Los genes *ddn*, *fbiA*, *fbiB*, *fbiC* y *fgd1* son las principales dianas dónde se concentran la mayoría de las mutaciones asociadas a la resistencia al Delamanid [Zhang Y 2015].

8. TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS

Existen varios factores a tener en cuenta a la hora de pautar un tratamiento antituberculoso, algunos de ellos relacionados con el bacilo y el paciente, como por ejemplo tener en cuenta la gravedad y la localización de la infección, el estado en el que se encuentre el bacilo (activo/latente), y la situación inmunológica. No obstante, también hay factores relacionados con los fármacos, como son la dosis, el tipo de fármaco (bactericida/esterilizante), la duración del tratamiento y los regímenes de este. En cuanto a la duración, puede variar según la pauta terapéutica, pero se ha de mantener un tiempo suficiente (6, 9 o 18-24 meses) para eliminar los diferentes tipos de poblaciones bacilares y evitar la aparición de recidivas. La eficacia de los medicamentos antituberculosos depende de las dosis a las que se usen, puesto que en

dosis bajas estos fármacos no tendrán el efecto deseado y causarán la aparición de resistencia (y el paciente ya no podrá volver a utilizarlos), pero en dosis altas darán lugar a efectos adversos que en ocasiones pueden ser muy graves. A su vez, su administración ha de ser simultánea y en una sola dosis, porque para eliminar el bacilo tuberculoso es mejor alcanzar picos séricos diarios que mantener concentraciones sanguíneas constantes, lo cual conlleva también un mejor seguimiento del cumplimiento terapéutico. La dosificación se ha de realizar en función del peso y la edad del paciente, y su administración es mejor en ayunas para evitar interacciones con los alimentos, siempre que sea posible.

El tratamiento para la tuberculosis ha de estar basado en una pauta farmacológica que incluya medicamentos con efecto bactericida, así como fármacos con acción esterilizante. Empleando diversos fármacos se evitará la selección de mutantes resistentes naturales que contienen las poblaciones bacilares. Los fármacos bactericidas actuarán en los primeros días y semanas sobre los bacilos que se encuentren replicándose de manera activa, reduciendo el nivel de infección en el paciente. Por otro lado, los fármacos con poder esterilizante actuarán en las siguientes semanas y meses sobre aquellos bacilos micobacterianos que no se estén replicando, con el fin de reducir la probabilidad de recaída [Horsburgh 2015]. La duración del tratamiento (6 o más meses), junto con los efectos adversos o toxicidades asociadas a los diversos fármacos, y la correcta adherencia al tratamiento por parte del paciente suponen las principales dificultades del tratamiento farmacológico de la tuberculosis. Por ello, la OMS recomienda la estrategia del “Tratamiento directamente observado” (en inglés *DOTS: Directly Observed Treatment*) [WHO Tuberculosis Report 2019].

En España, en general, el tratamiento de la tuberculosis se realiza de forma ambulatoria y autoadministrado. El aislamiento respiratorio estricto se aplica durante los primeros 15-21 días de tratamiento estándar, y una vez finalizado, se recomienda un aislamiento social durante 30 días. La reincorporación laboral se suele realizar entre 1 y 2 meses después de iniciar el tratamiento.

8.1. Pauta inicial

La pauta estándar (Tabla 2) según las diversas guías mundiales, incluidas las de la OMS, consiste en un régimen de 2 meses con Isoniacida, Rifampicina, Pirazinamida y Etambutol, seguido de 4 meses con Isoniacida y Rifampicina (2HRZE/4HR) [WHO Guideline treatment 2017], completando así un total de 6 meses de tratamiento. En el caso de la meningitis tuberculosa se prolongaría hasta 12 meses, y en la silicotuberculosis hasta los 9 meses. Esta pauta estándar debe realizarse en todos los casos de tuberculosis pulmonar y extrapulmonar diagnosticados por primera vez, y es útil cuando no hay confirmación ni sospecha de resistencia a los fármacos antituberculosos de primera línea. En el caso de que el antibiograma muestre sensibilidad a todos los fármacos, se podrá eliminar el Etambutol y continuar con los otros tres hasta finalizar la fase inicial. Hoy en día existen comprimidos que aúnan los cuatro fármacos (Rimstar®) o los tres fármacos (Rifater® y Rimcure®), permitiendo reducir el número total de comprimidos a tomar y mejorando la adherencia al tratamiento.

Como tratamiento inicial alternativo, el esquema de 6 meses pasaría a ser de 9 meses: 2 meses con Rifampicina, Isoniacida y Etambutol, seguido de 7 meses con Rifampicina e Isoniacida. Este régimen alternativo está indicado en paciente con gota y en la hepatopatía crónica grave. Existe también una pauta intermitente donde la administración es semanal y no diaria, pero se producen más efectos adversos.

8.2. Pauta situaciones especiales

8.2.1. Embarazo y lactancia

Durante el embarazo y la lactancia se puede aplicar el tratamiento estándar de 6 meses. El tratamiento con Isoniacida en embarazadas debe suplementarse con vitamina B6 (piridoxina) para evitar su neurotoxicidad, especialmente en el lactante alimentado exclusivamente con lactancia materna.

No tiene que evitar el uso de la Estreptomina porque es ototóxica para el feto.

8.2.2. Silicotuberculosis

Los enfermos de silicotuberculosis tienen que prolongar su tratamiento a 9 meses, puesto que la silicosis deteriora la función pulmonar de los macrófagos y genera alteraciones en el sistema inmunológico.

8.2.3. Insuficiencia renal

Entre los fármacos empleados, el Etambutol se debe administrar cada 48 horas en pacientes con la función renal alterada, mientras que la Isoniacida, Rifampicina y Pirazinamida se administran a las dosis habituales. Si el aclaramiento de creatinina es inferior a 30 mL/min, se puede administrar la misma pauta, pero tres veces por semana, y realizar monitorización sérica de los fármacos. Si el paciente está recibiendo diálisis, el tratamiento antituberculoso se le administrará después de la sesión de hemodiálisis.

8.2.4. Hepatopatía crónica

El enfermo seguirá la pauta habitual siempre y cuando no tenga alteraciones hepáticas. En caso de que existan, se realizarán controles analíticos, y si hay descompensación, se empleará una pauta no hepatotóxica.

8.2.5. Sida

La pauta inicial será la estándar de cuatro fármacos, con una duración total del tratamiento de 6 meses. No obstante, se puede alargar hasta los 9 meses si hay inmunodepresión importante. Si el paciente no está recibiendo tratamiento antirretroviral, se aconseja siempre que el estado inmunitario permita iniciar la quimioterapia de la TBC ($CD4 \geq 50$) y diferir su introducción hasta el tercer mes. Si los CD4 son inferiores a 50, se debe iniciar el tratamiento antirretroviral a los 15 días. Si el paciente ya recibe antirretrovirales, deberá ajustarse la medicación para hacer compatibles los dos tipos de fármacos. Es importante remarcar el hecho de que habrá un mayor número de efectos adversos farmacológicos, además de importantes interacciones entre la Rifampicina y los inhibidores de la proteasa.

8.3. MDR-TB y XDR-TB

La pauta estándar para los pacientes multirresistentes no es suficiente debido a las resistencias, con lo cual, en función de los resultados del DST, se le prescribe una

terapia individualizada. Organismos internacionales como la OMS sugieren una serie de pautas en base a la situación del paciente (Tabla 2): se recomienda una fluoroquinolona (Levofloxacino, Moxifloxacino, Gatifloxacino), un inyectable de segunda línea (Amikacina, Capreomicina, Kanamicina, Estreptomina), dos fármacos englobados en la categoría de “otros” (ETO/PTO, Cicloserina, Linezolid o Clofazimina) y la Pirazinamida (Tabla 2). La duración de este tratamiento es de 20 meses, divididos de la siguiente manera: 8 meses de fase intensiva, y 12 meses de fase de consolidación. Esta larga duración puede conllevar problemas de adherencia y toxicidad, tal y como se ha comentado anteriormente. Por este motivo la OMS también recomienda un régimen de 9-12 meses para los pacientes con MDR-TB, compuesto por: una fluoroquinolona (Moxifloxacino o Gatifloxacino), un inyectable de segunda línea (Kanamicina), PTO, Clofazimina, e Isoniacida, Rifampicina y Etambutol en concentraciones elevadas (Tabla 2).

Más complicada es la situación de los pacientes con XDR-TB, debido lógicamente al gran número de fármacos a los que son resistentes y que, por lo tanto, no pueden emplearse en su tratamiento limitando así su eficacia. El número de casos con XDR-TB ha ido incrementándose con los años, y en la actualidad representa algo más del 6% de los casos MDR-TB a nivel mundial. En estos casos, el tratamiento de la tuberculosis XDR ha de incluir 6 o más fármacos durante la fase intensiva, y 4 durante la fase de consolidación.

8.4. Quimioprofilaxis

En algunos casos muy específicos, se puede realizar la quimioprofilaxis antituberculosa para prevenir que un paciente infectado desarrolle la enfermedad (Tabla 2). Esto consiste en administrar medicación específica en individuos sin síntomas ni signos de enfermedad tuberculosa para prevenir la infección en pacientes expuestos al contagio, estando indicado en aquellas personas negativas a la tuberculina, que han estado en contacto íntimo con un tuberculoso pulmonar bacilífero, infectadas por *M. tuberculosis* y el VIH, en niños, en los portadores de lesiones radiológicas que sugieran una tuberculosis no tratada anteriormente, y en pacientes con tuberculosis dónde se prevea una inmunosupresión intensa.

INTRODUCCIÓN

Tabla 2. Resumen de los principales esquemas terapéuticos empleados en el tratamiento de la tuberculosis (adaptado de la OMS) [Caminero 2015; WHO Guideline treatment 2017].

Tratamiento	Fármacos	Duración tratamiento
Estándar	<ul style="list-style-type: none">· Isoniacida· Rifampicina· Etambutol· Pirazinamida	Pauta combinada de 6 meses (2HRZE/4HR): <ul style="list-style-type: none">· 2 meses fase intensiva con HRZE¹· 4 meses fase de consolidación con HR²
MDR-TB	<ul style="list-style-type: none">· 1 fluoroquinolona (Grupo A): LFX³ o MFX⁴· 1 inyectable (Grupo B): CAP⁵ o AMK⁶· 2 fármacos del Grupo C: PTO⁷ y Cicloserina· Pirazinamida	Pauta de 20 meses: <ul style="list-style-type: none">· 8 meses fase intensiva· 12-18 meses fase de consolidación
MDR-TB corto	<ul style="list-style-type: none">· 1 fluoroquinolona (Grupo A): MFX o GFX⁸· 1 inyectable (Grupo B): KAN⁹· 2 fármacos del Grupo C: PTO y CFZ¹⁰· Isoniacida, Etambutol y Pirazinamida a alta dosis	Pauta de 9-12 meses: <ul style="list-style-type: none">· 4 meses fase intensiva· 5 meses fase de consolidación
Quimioprofilaxis	<ul style="list-style-type: none">· Isoniacida· Rifapentina	Pauta de 3 meses

¹HRZE: Isoniacida, Rifampicina, Pirazinamida, Etambutol; ²HR: Isoniacida, Rifampicina; ³LFX: Levofloxacin; ⁴MFX: Moxifloxacin; ⁵CAP: Capreomicina; ⁶AMK: Amikacina; ⁷PTO: Protionamida; ⁸GFX: Gatifloxacin; ⁹KAN: Kanamicina; ¹⁰CFZ: Clofazimina.

La Isoniacida es esencial en la quimioprofilaxis, pues es bactericida, siendo capaz de disminuir o eliminar los bacilos persistentes en las lesiones del paciente infectado. Esa población bacilar no es suficientemente elevada como para que existan mutantes resistentes naturales a la medicación utilizada. El tratamiento quimioprofiláctico se ha de mantener durante 3 meses, tras los cuales se repetirá la tuberculina. Si da negativa, el tratamiento se puede suspender. Por el contrario, si da positiva, se continua con la medicación hasta un total de 6-9 meses.

9. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A LOS FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS

En la actualidad, es esencial realizar una prueba de sensibilidad a los principales fármacos contra la tuberculosis una vez se ha confirmado que el paciente presenta un cultivo positivo para este microorganismo. Entre las diferentes metodologías para determinar la sensibilidad, destacan los métodos basados en el patrón fenotípico (*gold*

standard o método de referencia) los cuales son económicos pero lentos, y también hay las técnicas moleculares que detectan mutaciones cromosómicas relacionadas con la resistencia fenotípica. Estas últimas son más costosas, pero presentan los resultados en menor tiempo, factor clave para establecer un tratamiento farmacológico.

9.1. Métodos fenotípicos

9.1.1. Métodos basados en medios de cultivo sólidos

Los primeros métodos fenotípicos de sensibilidad para el complejo *M. tuberculosis* fueron desarrollados en los años 60, y se basaron en el crecimiento/inhibición de la cepa en medios de cultivo sólido (primero se utilizó Löwenstein-Jensen y posteriormente 7H10 o 7H11) con una concentración fija de antibiótico. Existen diversas variantes: 1) el método de la *ratio* resistencia, donde se compara la CIM del aislamiento clínico frente al antibiótico con una cepa de referencia; 2) el de las concentraciones absolutas, que compara el número de colonias en el medio, con y sin fármaco; y 3) el de las proporciones críticas [Canetti Rist 1963], parecido al anterior pero estableciendo un gradiente de diluciones de antibiótico y observando el crecimiento proporcional entre ellas (comparado al medio sin antibiótico) [Canetti 1963]. No obstante, estas técnicas son costosas, laboriosas y peligrosas a nivel de bioseguridad, motivos por los cuales han sido muy relegadas de los laboratorios.

9.1.2. Método del Epsilon test

Otro ejemplo de prueba fenotípica que utiliza el medio sólido es el E-Test, descrito en 1988, y que consiste en una tira donde se aplica un gradiente de antibiótico para determinar la CIM de la cepa en una sola placa. Sin embargo, no está recomendado su uso para el antibiograma de *M. tuberculosis* complex porque requiere de una correcta interpretación para la lectura y el crecimiento es errático y poco homogéneo en la placa de agar.

9.1.2. Métodos basados en medios de cultivo líquidos

Con el paso de los años también se empezaron a utilizar más los medios líquidos al ser más rápidos, sencillos y automatizables. En los años 80 surgió la técnica que ha sido de referencia durante casi 30 años: el sistema radiométrico Bactec 469TB (Becton Dickinson) [Roberts 1983]. Se utilizaba el medio 7H9 modificado (el ácido palmítico

contenía carbono radiactivo; C^{14}), al cual se le añadía antibiótico a una cierta concentración. Este sistema detecta cuantitativamente la cantidad de $^{14}CO_2$ producto del metabolismo bacteriano en términos de índice de crecimiento (*growth index*; GI), siendo la cantidad de $^{14}CO_2$ proporcional al grado de crecimiento. Este sistema puede ser usado para todos los fármacos de primera línea y segunda línea. Los viales se leen diariamente, un mínimo de 4 días, hasta que el vial de control alcanza un GI >30, interpretándose la sensibilidad y resistencia según la progresión de las lecturas de crecimiento (GI) respecto al control sin antibiótico. Con este sistema el tiempo de incubación se acortó, pudiendo obtener los resultados en 5-12 días. Además, se demostró que es un método más preciso que método de sensibilidad a los fármacos en placa para identificar el 1% de la población resistente de *Mycobacterium tuberculosis* [Tarrand 1985]. El mayor inconveniente es manipular isótopos radiactivos y ser un sistema semiautomático. Por estos motivos este método ha sido retirado, siendo sustituido por los sistemas no radiométricos.

En la actualidad, el método de sensibilidad fenotípico más utilizado es el sistema de cultivo automático MGIT 960 (también usa 7H9 modificado) que detecta por fluorescencia el consumo de oxígeno derivado del crecimiento o inhibición del microorganismo en presencia del antibiótico. Una alternativa al MGIT 960, también muy utilizada, es el VersaTrek (TREK Diagnostics), que detecta el consumo de oxígeno mediante sensores de presión, derivado del crecimiento o inhibición del microorganismo en presencia del antibiótico [Espasa 2012]. Cada fabricante suministra los fármacos para SIRE (Estreptomina, Isoniacida, Rifampicina, Etambutol) y Pirazinamida para realizar las pruebas de sensibilidad, que una vez reconstituidos se dispensan en los diferentes viales de cultivo para cada fármaco. Además, debe incluirse un vial sin fármaco como control de crecimiento diluido al 1:100. Las concentraciones críticas iniciales y secundarias que se analizan con estos sistemas, vienen predeterminados por el fabricante para los fármacos de primera línea. No obstante, también es posible analizar concentraciones críticas de otros fármacos de segunda línea si se dispone de sustancia valorada (aunque no siempre existe consenso para los puntos de corte de estos fármacos). Estos sistemas incorporan un algoritmo de interpretación de los resultados que simplifica la emisión de los informes. Su

sensibilidad y rapidez están bastante cercanas al sistema radiométrico y no utiliza sustancias radioactivas, siendo sus principales ventajas. Como inconvenientes cabe señalar la escasa flexibilidad en la valoración de las lecturas de crecimiento.

Las CIM de los fármacos antituberculosos de primera línea que recomienda la OMS para el MGIT 960, son 0,1 µg/ml de Isoniacida, 1 µg/ml de Rifampicina, 5 µg/ml de Etambutol, y 100 µg/ml de Pirazinamida. En el caso de la Estreptomina, su CIM es de 1 µg/ml. La determinación de la sensibilidad a la Pirazinamida es algo diferente debido a que el pH del medio de cultivo ha de ser de 5,5 para así detectar la pirazinamidasa, de modo que la presencia de la enzima indica que es sensible a este fármaco, y su ausencia que es resistente. En cuanto a los fármacos de segunda línea, las CIM recomendadas para este sistema son las siguientes: 1 µg/ml de Amikacina, 2,5 µg/ml de Capreomicina, 1 µg/ml de Levofloxacino, 2 µg/ml de Ofloxacino, 0,25 µg/ml de Moxifloxacino, 1 µg/ml de Linezolid, 5 µg/ml de Etionamida, y 2,5 µg/ml de Kanamicina [WHO CC DST 2018].

En el caso de la Pirazinamida, la determinación de sensibilidad es algo diferente. Para que sea fiable, el pH del medio de cultivo debe adecuarse a las condiciones de pH 5,5 para permitir así la acción del fármaco. No obstante, hasta un 10% de los aislamientos de *M. tuberculosis* son incapaces de crecer a este pH, lo cual hace difícil su interpretación. Este problema es más importante con el medio de Löwenstein-Jensen y por ello se realizó una adaptación en agar 7H10 de Middlebrook a pH 5,5, sin ácido oleico, ya que, a este pH, este ácido tiene un efecto inhibitor. Sin embargo, las dificultades de crecimiento en algunas cepas han persistido. En 1985 [Heifets 1985] se adaptaron las pruebas de sensibilidad a la Pirazinamida al sistema radiométrico en BACTEC® 460TB, elevando la concentración crítica a 100 mg/L en medio de cultivo 7H12 de Middlebrook a pH 5,95, obteniendo resultados equivalentes. Con el método radiométrico se lograba un crecimiento de la práctica totalidad de las cepas y aunque durante mucho tiempo ha sido considerado el método de referencia para la detección de sensibilidad a este fármaco, en la actualidad se encuentra descatalogado. Existen sistemas alternativos automáticos y no radiométricos (sistema BACTECTM MGITTM 960 PZA y sistema VersaTrek® PZA) que realizan el estudio de la Pirazinamida, aunque

con resultados no tan óptimos como los obtenidos con el método radiométrico BACTEC® 460TB.

9.1.3. Métodos de sensibilidad alternativos

Se han desarrollado diferentes procedimientos fenotípicos con la intención de determinar la resistencia a los fármacos de una forma más rápida y/o más sencilla que con los métodos convencionales y, sobre todo, más económica.

9.1.3.1. Citometría de flujo

La citometría de flujo es un ejemplo de método alternativo. Esta técnica utiliza colorantes de ácidos nucleicos permeables a nivel celular que evidencian un incremento de la fluorescencia cuando se unen a estos ácidos. Las micobacterias viables (los controles y las resistentes a los fármacos) presentarán una señal fluorescente en comparación con las sensibles a los fármacos (no viables). Por motivos de seguridad suelen inactivarse todas previamente por calor sin que la tinción de las diferentes poblaciones se vea afectada. Las micobacterias se incuban 10 días, y se prepara una suspensión equivalente al nº1 de la escala de McFarland, para después inocular los viales de caldo 7H9 de Middlebrook con los diferentes fármacos y los controles correspondientes, que se incubarán 72 horas más. Una vez completada la incubación, se inactivan en autoclave y se centrifugan para obtener el sedimento que será utilizado en el procedimiento de tinción y lectura en el citómetro. El mayor inconveniente esta metodología es su elevado coste por el equipamiento requerido.

9.1.3.2. Microdilución

Otro método alternativo es la microdilución en caldo. Además de poder hacerlo de forma "casera" (*home made*), existe en la actualidad un producto comercial (MYCOTB sensititre® plates; TREK Diagnostics), en el que se incluyen diversos fármacos liofilizados con unos intervalos de concentraciones para establecer la CIM de cada uno de ellos. Esta técnica permite analizar fármacos de primera línea (Isoniacida, Rifampicina, Etambutol y Estreptomina) y segunda línea (Amikacina, Kanamicina, Rifabutina, Ofloxacino, Moxifloxacino, Etionamida, Cicloserina y PAS) de manera simultánea. La CIM se corresponde con la menor concentración de cada antimicrobiano en la que no se detecta crecimiento visible. Destacan su sencillez y el

hecho de ser un método económico, cuya mayor dificultad reside en la lectura e interpretación de las CIM, derivada del crecimiento no homogéneo de estos microorganismos.

9.1.3.3. Prueba de la nitrato reductasa (nitrate reductase assay, NRA)

Se trata de una prueba no comercial basada en la capacidad del complejo *M. tuberculosis* para reducir los nitratos a nitritos. Se utilizan tubos de Löwenstein-Jensen (L-J) que incorporan KNO_3 . Se trabaja con dos tamaños de inóculo: uno será equivalente al nº1 de la escala de McFarland para los tubos de L-J que contienen los fármacos, y el otro está diluido al 1:10 para los tubos de control (sin fármaco). Tras una incubación de 7-14 días a 37°C, se estudia la posible reducción de los nitratos con reactivos específicos que indicaría, la presencia de micobacterias viables (color magenta) y, por tanto, resistencia al fármaco estudiado. Esta técnica se puede utilizar directamente en muestras respiratorias, con baciloscopia positiva, o como una prueba indirecta a partir de cultivos positivos, que no sería más rápida que las pruebas de sensibilidad clásicas en medios sólidos. Dada su muy buena sensibilidad (97%) y especificidad (99%), la OMS la contempla como una prueba para el cribado de la sensibilidad a la Isoniacida y Rifampicina en países de bajos recursos económicos, al ser también económica y sencilla de realizar.

9.1.3.4. Observación microscópica de la sensibilidad a los fármacos (microscopic-observation drug-susceptibility, MODS)

Es un método no comercial desarrollado en Perú y que se basa en la observación de la formación de cuerdas (*cord factor*), características del complejo *M. tuberculosis*, cuando crece en los medios líquidos, y que son visualizadas tempranamente mediante un microscopio de luz invertida. El objetivo es la detección rápida y sencilla de la sensibilidad a la Isoniacida y Rifampicina. Se utiliza un medio líquido (7H9 de Middlebrook suplementado con casitona, glicerol, OADC y PANTA) en placas de microdilución. Unos pocillos tendrán los fármacos en concentraciones críticas, mientras que otros actuarán de control al no contener antibióticos. Tras la inoculación, la placa se tapa y se incuba con CO_2 a 37°C. Posteriormente, con un microscopio invertido a 40x, se examinará a las 48 horas la posibilidad de contaminaciones y, a partir del quinto día, en busca de la presencia de cuerdas (micobacterias viables). Una

cepa se considerará resistente a los fármacos incluidos en los pocillos en los que se desarrollen cuerdas. Los resultados suelen estar disponibles entre 7 y 14 días. Esta prueba también es considerada por la OMS como una prueba de rápida de cribado para la isoniacida y rifampicina en países con bajos recursos por su sensibilidad (97%) y especificidad (98%).

9.1.3.5. Prueba de microtitulación con Resazurina

Esta prueba no comercial se fundamenta en la detección de cambios de color en el medio de cultivo, condicionados por la oxidación-reducción de la resazurina. Para ello se utiliza el caldo 7H9 de Middlebrook (suplementado con casitona, glicerol, OADC y PANTA) en placas de microdilución, con unos pocillos con diversas concentraciones de antimicrobianos y otros de control sin ellos. Tras la inoculación de la placa y 7 días de incubación a 37°C, se añade una solución de resazurina a todos los pocillos, volviendo a incubar la placa 1 noche más. La presencia de un cambio de color de azul (estado oxidado) a rosa (estado reducido) es indicativo de crecimiento micobacteriano. La CIM corresponderá a la menor concentración de un fármaco determinado en la que no se produce cambio de color. La sensibilidad de este método ha demostrado ser muy buena (98%), así como su especificidad (98%). Además, es una prueba sencilla y económica. Por estos motivos, la OMS también la considera una alternativa en países de baja renta *per cápita*, para la detección de la resistencia a la Isoniacida y Rifampicina en el complejo *M. tuberculosis*.

9.2. Métodos de detección rápida de la resistencia antibiótica

Los métodos convencionales de sensibilidad antibiótica son lentos, tal y como se ha mencionado anteriormente, y se tardan muchos días e incluso semanas hasta poder ver el crecimiento de la cepa. Por este motivo, se han desarrollado nuevos métodos (sistemas para la detección molecular de la resistencia directamente en muestra clínica) que permiten predecir el fenotipo de resistencia en un periodo de tiempo menor.

9.2.1. Micobacteriófagos

En las técnicas basadas en micobacteriófagos, al añadir los fagos a un cultivo en presencia de antibiótico, estos infectarán únicamente las micobacterias viables, que

serán las resistentes [Jacobs 1993]. Solo dos métodos han demostrado tener cierta utilidad clínica: el LRP (*Luciferase Reporter Phage*) y el FASTPlaqueTBTM (BIOTEC) o PhageTeK MB® (Organon Teknika). Estos métodos se diferencian básicamente en la detección de las células micobacterianas infectadas por el fago: en el LRP se utiliza la emisión de luz que es codificada por el gen de la luciferasa, mientras que en el FASTPlaqueTBTM o PhageTeK MB®, la detección se basa en la presencia de múltiples células micobacterianas infectadas viables tras una amplificación fágica (micobacteriofago D29) en *M. smegmatis*.

Entre sus ventajas destacan su aceptable sensibilidad y especificidad, su rapidez (48 horas), son sencillas y económicas, pero es un método difícilmente estandarizable y con una alta tasa (20%) de contaminaciones.

9.2.2. Técnicas moleculares

El gran avance en la detección rápida de la resistencia bacteriana han sido el desarrollo de las técnicas moleculares, permitiendo predecir el fenotipo de sensibilidad con días de antelación. A pesar de ello, es importante remarcar el hecho de que no han sustituido a las pruebas de sensibilidad fenotípicas convencionales, ya que una mutación genética no implica en el 100% de los casos una resistencia fenotípica. Existen cambios nucleotídicos que no implican cambios aminoacídicos, o cambios aminoacídicos que no suponen cambios proteicos y, por tanto, no se traducen en resistencia. Por otro lado, puede que hayan mutaciones en otras dianas desconocidas o infrecuentes (no incluidas en la técnica molecular en cuestión), de manera que la cepa podría ser resistente a pesar de presentar un genotipo *wild type* en las dianas contempladas en la técnica molecular que se ha utilizado.

Existen numerosas técnicas moleculares orientadas tanto a la identificación de *M. tuberculosis* complex, como a la detección de mutaciones en genes relacionados con la resistencia a los fármacos antituberculosos. Si bien es cierto que hay técnicas caseras, se recomienda el uso de sistemas comerciales por su estandarización, bajo coste y disminución de contaminación cruzada (muchos están automatizados o semiautomatizados).

9.2.2.1. PCR-single-strand conformation polymorphism (SSCP)

En la década de los 90 se desarrolló un método basado en la detección de los cambios conformacionales de las cadenas simples de ADN, las cuales contenían mutaciones puntuales, llamado *single-strand conformation polymorphism* (SSCP) [Telenti SSCP 1993]. Una vez realizada la amplificación del gen diana y la desnaturalización de la doble cadena, la visualización de la conformación de la cadena de ADN generada puede realizarse por electroforesis en un gel de agarosa, o bien con los picos de fluorescencia emitidos si se utilizan cebadores marcados con fluoresceína. Aunque varios estudios sitúan su sensibilidad y especificidad en un 80% y 95%, respectivamente, para la detección de resistencia a la rifampicina [Xu 2010], el uso de esta técnica es más amplio en estudios de cribado generales.

9.2.2.2. Hibridación en fase sólida (tiras de celulosa)

Una gran parte de las técnicas de detección molecular de resistencia en *M. tuberculosis* complex utilizan esta metodología, que consiste en la amplificación del material genético por una PCR convencional junto con una posterior hibridación reversa en tiras de nitrocelulosa donde se obtiene un resultado colorimétrico. Entre los kits comerciales disponibles, destacan el INNO-LiPA Rif.TB (Innogenetics, Ghent, Belgium) y el GenoType MTBDR/*plus/sl* (Hain Lifescience, Nehren, Germany), ambos aprobados por la OMS. En el caso del INNO-LiPA, se amplifica la región *core* del gen *rpoB* para detectar 4 mutaciones relacionadas con la resistencia a la Rifampicina (S531L, D516V, H526D y H526Y). A pesar de su magnífica especificidad (98,4%), los estudios demuestran una baja sensibilidad (69,5%), respecto a los datos fenotípicos de las pruebas de sensibilidad fenotípicas a los fármacos antituberculosos (DST) a partir del cultivo. Está validado para su aplicación en rutina únicamente en aislamientos clínicos, con sensibilidad y especificidad global del 95-100%, aunque algunos estudios muestran una buena sensibilidad también en muestra directa, con baciloscopia positiva [Tortoli 2007]. Este hecho, junto al apoyo y recomendaciones de la OMS, ha provocado que muchos laboratorios se hayan decantado por el GenoType.

Existen varias pruebas comerciales de GenoType, como el MTBDR, que además de presentar las mismas dianas que el INNO-LiPA Rif.TB para el gen *rpoB*, también incluye dianas para el gen *katG* de la Isoniacida (S315T1 y S315T2), y así tratar de detectar

resistencia de alto nivel a este fármaco. Posteriormente apareció el GenoType MTBDR*plus*, que permite detectar mutaciones hasta 28 mutaciones en el gen *rhoB* (F505L, T508A, S509T, E510H, L511P, Q513L, Q513P, del514-516, D516V, D516Y, del515, del518, N518I, S522L, S522Q, H526Y, H526D, H526R, H526P, H526Q, H526N, H526L, H526S, H526C, S531L, S531Q, S531W, L533P), 2 en *katG* (S315T1 y S315T2) y 4 mutaciones en *inhA* (C15T, A16G, T8C, T8A), con una sensibilidad del 98,7% para la Rifampicina y del 82,1% para la Isoniacida, utilizando el DST como método de referencia [Jian 2018]. Es importante remarcar el hecho de que el MTBDR*plus* permite su aplicación también en muestra directa con baciloscopia positiva.

Los resultados del GenoType MTBDR en muestra clínica directa para la detección de mutaciones relacionadas con la resistencia a Rifampicina es elevada (92%) y en la Isoniacida notable (70%), aunque en la versión MTBDR*plus* se consigue una mayor sensibilidad [Hillemann 2006; Barnard 2008]. Hay que tener en cuenta que la menor sensibilidad de detección de resistencia en la Isoniacida se debe en parte a la variedad de dianas genéticas, no todas conocidas, implicadas en la resistencia. En estos ensayos sólo se cubre la mutación en *katG* y región promotora de *inhA* que no explican la totalidad de las resistencias a este fármaco.

En caso de necesitar estudiar la sensibilidad a los fármacos antituberculosos de segunda línea, el sistema GenoType posee un kit llamado GenoType MTBDR*sl*, con la versión 1 y 2. La versión inicial permite detectar 9 mutaciones en el gen *gyrA* de las fluoroquinolonas (C88S, A88T, A90V, S91P, D94A, D94N, D94Y, D94G, D94H), 3 mutaciones en el gen *rrs* de los inyectables de segunda línea (A1401G, C1402T, G1484T), y 3 en *embB* del Etambutol (M306I ATG→ATA, M306V, M306I ATG→ATC/ATT). La sensibilidad en esta técnica es de un 85,6% en fluoroquinolonas, y 76,5% en inyectables de segunda línea, utilizando el DST basado en cultivo como método de referencia [Theron 2016]. Por otro lado, la versión 2 permite detectar 9 mutaciones en el gen *gyrA* (G88A, G88C, A90V, S91P, D94A, D94N, D94Y, D94G, D94H) y 2 en *gyrB* (N538D, E540V) de las fluoroquinolonas, 3 en el gen *rrs* de los inyectables de segunda línea (A1401G, C1402T, G1484T), y 5 en el gen *eis* de la Kanamicina (G37T, C14T, C12T, G10A, C2A). En este caso, la sensibilidad obtenida para las fluoroquinolonas y los inyectables de segunda línea es mayor (97% y 89%,

respectivamente), empleando como *gold standard* el DST basado en cultivo [Theron 2016].

En 2003 se realizó un meta-análisis que muestra que esta técnica (MTBDRs/) es sensible y específica en cepas clínicas en la detección de resistencia a las fluoroquinolonas, la Amikacina y Capreomicina (sensibilidad entre el 82 y el 87%), pero no es tan sensible en la detección de resistencia al Etambutol (68%) y Kanamicina (44%) [Feng 2013]. Los resultados en muestra clínica directa son similares [Ajmani 2012], aunque la sensibilidad en la detección de mutaciones en el codón 306 del *embB* y el fenotipo resistente es menor (56%).

9.2.2.3. Técnicas de PCR a tiempo real

En los últimos años ha surgido nuevas técnicas que permiten disminuir al mínimo la manipulación de la muestra y el riesgo de contaminación cruzada, además de acortar el tiempo de obtención de resultados por la eliminación de fases intermedias, gracias al hecho de amplificar e hibridar simultáneamente el producto de la amplificación del ADN con sondas marcadas con fluorescencia, y no de amplificar e hibridar por separado. En este sentido destacan métodos como el Xpert MTB/RIF, y su reciente versión Xpert MTB/RIF Ultra. Ya mencionados anteriormente, son capaces de detectar las mutaciones relacionadas con la resistencia a la Rifampicina. La amplificación del material genético se basa en una PCR a tiempo real, utilizando cinco sondas para cubrir una región (RRDR) de 81 pb del gen *rpoB*, abarcando desde el codón 507 hasta el 533. La hibridación de al menos 3 sondas significa detección de *M. tuberculosis* complex y, a su vez, la hibridación de 3 o 4 (todas menos 1 o 2) evidencia al menos una sustitución nucleotídica en la secuencia *wild type* del gen, con lo que se relaciona con resistencia a la Rifampicina.

Su rendimiento con muestras baciloscopia negativas está avalado por diferentes estudios [Helb 2010; Boehme 2010], los cuales corroboran una buena sensibilidad (75%). Tras la revisión de los estudios publicados hasta la fecha acerca de la efectividad del Xpert MTB/RIF, la OMS publicó en 2011 una serie de recomendaciones acerca del uso de este ensayo en los laboratorios de diagnóstico de tuberculosis. En un primer lugar, recomendó la realización de este test como primera herramienta de diagnóstico

en países con alta incidencia de tuberculosis multirresistente o coinfección con el VIH. En el resto de países, recomienda considerar este test como segundo sistema de diagnóstico (tras la microscopía), en casos de baciloscopia negativa. Estas recomendaciones sólo se aplicaron al diagnóstico de la tuberculosis pulmonar [WHO Xpert 2011]. Inicialmente, la técnica Xpert MTB/RIF sólo se validó para muestras respiratorias, por lo que los estudios disponibles en la literatura están realizados predominantemente en este tipo de muestras. Con los años, surgieron estudios en muestras extrapulmonares en adultos e incluso en niños [Nicol 2011]. Sin embargo, la mayoría de los trabajos publicados en muestras extrapulmonares incluyen un bajo número de muestras [Hillemann 2011; Armand 2011; Causse 2011], o bien están realizados en zonas de alta incidencia tuberculosa [Vadwai 2011].

Ante estos motivos, se desarrolla una actualización del cartucho del Xpert MTB/RIF, que pasa a ser llamado Xpert MTB/RIF Ultra. Con esta nueva versión, recomendada por la OMS desde 2017 [WHO Tuberculosis Report 2019] se pretende mejorar la sensibilidad en muestras de origen extrapulmonar (muestras paucibacilares, con una menor carga bacilar) añadiendo, entre otras mejoras, una nueva categoría de detección (“Trace”). Se introducen también nuevas dianas (las secuencias de inserción IS1081 e IS6110) y los resultados se obtienen en un tiempo menor. Esta técnica también se ha evaluado en adultos enfermos de tuberculosis pulmonar con una sensibilidad del 88% y una especificidad del 96% [Dorman 2018], en niños enfermos de tuberculosis pulmonar con una sensibilidad del 75,3-77,5% y una especificidad del 96,9-99% [Zar 2017; Nicol 2018], y en pacientes infectados por el VIH con una sensibilidad del 88% y una especificidad del 83% [Dorman 2018], todos ellos comparando los resultados con los obtenidos método de referencia (DST) basado en cultivo. En un estudio de revisión Cochrane, con muestras respiratorias, se observó una sensibilidad global del Xpert MTB/RIF y de su versión Ultra del 95% para la detección de mutaciones en el gen *rpoB* [Horne 2019], respecto al estándar de referencia que era el cultivo para tuberculosis y las pruebas de sensibilidad a los fármacos basadas en cultivo (DST). En relación a estos sistemas, es importante remarcar la presencia, poco frecuente pero real, de mutaciones silentes en el gen *rpoB* en cepas de *M. tuberculosis* complex, comentada por varios estudios [Alonso 2011; Moure Letter 2011]. Los

autores describen un fenómeno ya observado por varios grupos de estudio: se notifican resultados de “resistencia a la Rifampicina detectada” en los que hay falta de hibridación con la sonda B, pero eran fenotípicamente susceptibles a la Rifampicina, y que se confirmó posteriormente mediante secuenciación (cambio silente de TTC a TTT). Este hecho destaca la importancia de una correcta interpretación de los resultados de resistencia a la Rifampicina cuando se trabaja con pruebas moleculares, pues este fármaco es muy importante en el tratamiento antituberculoso. Por otro lado, también remarca la necesidad de confirmar los resultados obtenidos de resistencias a los medicamentos mediante las pruebas moleculares: estos métodos son de gran utilidad, pero las pruebas de sensibilidad a fármacos siguen siendo el método de referencia para determinar la resistencia real a los fármacos antituberculosos.

Otra prueba molecular disponible es el Anyplex II MTB/MDR/XDR, que permite la detección simultánea de *M. tuberculosis* complex y su resistencia ante fármacos antituberculosos de primera línea (Isoniacida y Rifampicina) y segunda línea (fluoroquinolonas y fármacos inyectables). Esta prueba se basa en una PCR multiplex en tiempo real donde se usan oligonucleótidos de cebado doble, que generan alta especificidad, eliminando la competencia de los cebadores. Además, cuenta con la tecnología TOCE, que permite la identificación de objetivos múltiples (es una prueba *multiplex*) de manera simultánea, mediante el uso de las diferencias en las temperaturas de fusión de amplicones artificiales diseñados. Esta tecnología TOCE permite evitar que una pequeña variación en las secuencias de los amplicones modifique la temperatura de fusión. De este modo, se realiza un análisis de objetivos múltiples con un marcador fluorescente, asegurando que la variación de la secuencia no cambie la temperatura de fusión. Este ensayo cubre 7 mutaciones del gen *katG* y la región promotora del gen *inhA* (Isoniacida), 18 mutaciones que afectan al gen *rpoB* (Rifampicina), 7 mutaciones relacionadas con el gen *gyrA* (fluoroquinolonas) y 6 mutaciones que afectan al gen *rrs* y a la región promotora *eis* (Kanamicina, Capreomicina, Amikacina). Varios estudios muestran sensibilidades del 61-91,5% para la Isoniacida, 93,8-97,9% para Rifampicina, 80-95% para fluoroquinolonas, y 50-100% para aminoglucósidos [Causse 2015; Igarashi 2017; Pérez-García 2017]. Estos resultados fueron comparados con los obtenidos mediante las pruebas de sensibilidad

fenotípicas a los fármacos antituberculosos (DST), y la secuenciación del ADN en caso de discrepancias.

9.2.2.4. Microarrays

Los microchips o *microarrays* de ADN son sistemas de hibridación en fase sólida en miniatura. Se basan en una amplificación (PCR) y una hibridación adicional con sondas de oligonucleótidos inmovilizados en un soporte sólido (no es nitrocelulosa) y se disponen de manera regular. El ácido nucleico que se desea detectar se marca con una sustancia fluorescente o radioactiva [Doménech-Sancheza 2004]. La principal ventaja de este sistema es la posibilidad de detectar una gran cantidad de genes, incluidos aquellos que presentan mutaciones a determinados fármacos antituberculosos, siendo una técnica muy versátil. Varios estudios demuestran que puede ser una buena herramienta para la detección rápida de las mutaciones en el gen *embB* del Etambutol, con una sensibilidad y especificidad del 100% [Moure 2014] respecto al DST y la secuenciación, y también de gran utilidad para la detección rápida de las mutaciones más comúnmente relacionadas con la resistencia a la estreptomina y las fluoroquinolonas, con una sensibilidad de detección de mutaciones del 92,5% en el caso de la Estreptomina y 87,5% en el caso de las fluoroquinolonas, respecto a la secuenciación [Moure 2013]. Sin embargo, debido a la escasez de sistemas comerciales, su uso no está del todo extendido y, en cierta manera, se le considera una técnica casera (*home made*), lo cual conlleva dificultades en su estandarización y en los controles de calidad.

9.2.2.5. Secuenciación

La secuenciación puede emplearse tanto a nivel de identificación de especie, como para detectar la resistencia farmacológica, ya que permite observar la presencia de mutaciones en el fragmento amplificado directamente a través de su secuencia nucleotídica. Por problemas de sensibilidad hasta el momento, sólo es posible aplicarla sobre aislamientos clínicos. No obstante, su uso en rutina no está extendido, debido a la gran complejidad metodológica (requiere personal cualificado) y su elevado coste económico. Con el auge de las nuevas tecnologías, se están desarrollando sistemas que

empleen metodologías de secuenciación más simples y económicas, para poder ser una alternativa real en el diagnóstico molecular de rutina.

La pirosecuenciación sería un ejemplo de ello. Esta técnica ha sido evaluada para la detección de los dos fármacos que definen la multirresistencia, tanto en cepa como en muestra directa [García-Sierra 2011]. También se ha evaluado para la detección de resistencia a fármacos de segunda línea en aislamientos clínicos [Engstrom 2012] con sensibilidades que rondan el 85% comparado con la sensibilidad fenotípica (Bactec 460TB).

En los últimos años se está potenciando mucho la secuenciación de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés), la cual se refiere a una serie de tecnologías utilizadas para secuenciar masivamente fragmentos de ADN [Moreno-Molina 2019]. Hoy en día, las plataformas NGS se basan en lecturas cortas con bajas tasas de error, siendo altamente fiables. Este hecho la ha convertido en una interesante herramienta que puede ser de gran utilidad para el diagnóstico de múltiples enfermedades e infecciones genéticas. En el caso de *M. tuberculosis* complex, por su pequeño genoma bacteriano, a priori puede ser un buen candidato para este tipo de tecnología como aplicación diagnóstica. Aquí, sería más interesante realizar la secuenciación completa del genoma (WGS, por sus siglas en inglés), para poder estudiar prácticamente todos los genomas de las cepas aisladas en los laboratorios de microbiología clínica. Ya hay estudios demostrando que, basándose en una lista conocida de mutaciones asociadas a la resistencia a fármacos, se podrían alcanzar altos valores de sensibilidad y especificidad para la Isoniacida y la Rifampicina [Bradley 2015]. Entre las ventajas de la WGS, destaca poder volver a analizar la secuencia y rastrear la red epidemiológica de la cepa. Por el contrario, entre sus inconvenientes hay que mencionar que, en países con una alta carga de resistencia a los fármacos antituberculosos, las capacidades de secuenciación siguen siendo limitadas y caras.

10. VACUNAS

En la actualidad, la única vacuna desarrollada y disponible para la tuberculosis es la BCG (bacilos Calmette-Guérin). Esta vacuna, utilizada por primera vez en 1921,

contiene bacilos vivos atenuados de *M. bovis*, y aunque en sus inicios se administraba por vía oral, hoy en día se inocula por vía intradérmica, produciendo sensibilidad cutánea a la prueba de la tuberculina y dejando una cicatriz muy característica. Esta vacuna se encuentra en entredicho, entre otros motivos, por su eficacia (0-80%), porque no protege de la reinfección, y porque no ayuda a prevenir formas pulmonares. Entre los factores atribuibles a esta eficacia tan variable, destacan las características de la propia vacuna (hay variedades más inmunogénicas como la BCG Tokyo o la BCG Pasteur) y las interacciones entre la persona vacunada y la vacuna. A pesar de todo esto, hay estudios en los que se ha demostrado que la BCG es de utilidad en la prevención de meningitis y tuberculosis diseminada en lactantes y niños pequeños (población infantil) [Brewer 2000], motivo por el cual la OMS recomienda que se aplique en aquellos países de baja renta per cápita con alta prevalencia de tuberculosis.

Las deficiencias y limitaciones de la vacuna actual han promovido la investigación y desarrollo de nuevas vacunas contra esta enfermedad. Después de más de una década de ensayos clínicos, surgió la vacuna MVA85A, desarrollada por la Universidad de Oxford [Tameris 2013], basado en el antígeno Ag85A que se integra en el ADN de un virus no replicativo (virus Ankara), pero su resultado final mostró una escasísima eficacia. Este fracaso terapéutico resultó ser positivo para la comunidad científica, que siguió buscando nuevos candidatos de vacuna. Ahora mismo existen dos grandes organizaciones encargadas de coordinar esta búsqueda: TBVI, de origen europeo, y AERAS, de origen estadounidense. Actualmente hay 12 vacunas contra la tuberculosis en fase de ensayos clínicos [Martín 2018], muchas de ellas basadas en subunidades antigénicas, aunque otras se fundamentan en el uso de micobacterias inactivadas. Entre estas 12, destacan la VaccaeTM (en fase III de eficacia), con el soporte de AERAS y que utiliza formas inactivadas de MNT, la vacuna RUTI (fase IIa) del Hospital Germans Trias i Pujol (Can Ruti) que emplea fragmentos de pared de *M. tuberculosis* vehiculizados en liposomas [Vilaplana 2018], y la MTBVAC desarrollada por la Universidad de Zaragoza y el Instituto Pasteur con el apoyo de TBVI, la cual parece mostrar una respuesta de células T más duradera a diferentes antígenos de *M. tuberculosis* no presentes en BCG [Martín 2018].

JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis constituye, en la actualidad, uno de los problemas sanitarios de mayor gravedad en el mundo, donde se estima que un tercio de la población está infectada por *Mycobacterium tuberculosis* complex, y sigue siendo una de las diez enfermedades infecciosas que más muertes al año provoca en todo el planeta, situándose por encima de la infección por el VIH. Para un correcto control de la tuberculosis, es esencial disponer de un diagnóstico precoz de la enfermedad activa mediante una correcta identificación del microorganismo, para así frenar el avance de la enfermedad y evitar el contagio a más personas.

La aparición de resistencias a los fármacos en el complejo *M. tuberculosis*, aunque conocida desde los inicios de la quimioterapia, ha surgido en los últimos años con una especial relevancia y gravedad [WHO Tuberculosis Report 2020]. Por ello, la OMS está realizando un gran esfuerzo en incrementar y potenciar los programas de vigilancia continua para analizar su evolución y poder establecer medidas globales para su control. En España, los datos de sensibilidad y resistencia en tuberculosis no siempre están disponibles en las declaraciones de los casos [Centro Nacional de Epidemiología 2015], y los datos existentes son derivados, por tanto, de diversos estudios más o menos representativos a nivel geográfico y/o temporal como son el ECUTTE, RETUBES, y otros realizados por el GEM (Grupo Español de Micobacteriología) y la UITB (Unidad de Investigación en TB de Barcelona), entre otros más locales [Martín-Casabona 2000; Pérez del Molino Bernal 2005; Tirado Balaguer 2006; Sanz Barbero 2007; Jiménez 2008; Caylà 2009; Blanquer 2014]. En general, se observa una gran variabilidad geográfica y entre estudios, con una tasa de resistencia a algún fármaco antituberculoso del 1-9,2%, siendo resistentes a la Isoniacida en el 1-8,3% de los pacientes nuevos sin tratamiento previo y del 15-22,6% en pacientes previamente tratados, ascendiendo en ambos grupos a un 10,2% y 40%, respectivamente, en los pacientes inmigrantes.

La repercusión clínica de poseer una cepa resistente es enorme ya que puede conllevar una mayor gravedad de la enfermedad, cambios en el tratamiento (número y tipo de fármacos y duración del mismo), con una menor tasa de curación y una mayor probabilidad de efectos adversos y secuelas funcionales. La confirmación definitiva de la resistencia debe realizarse con métodos microbiológicos [CLSI 2011]. Así, la

realización de las pruebas de sensibilidad fenotípicas convencionales a los pacientes nuevos (sin tratamiento previo), logra un seguimiento prospectivo de las tasas de resistencia que permite establecer esquemas terapéuticos empíricos útiles en la población de pacientes de un país o área concreta. En la actualidad, la mayoría de los laboratorios de microbiología de los hospitales de tercer nivel en España, realizan las pruebas de sensibilidad en todos los pacientes nuevos de tuberculosis y mediante métodos estandarizados en medios líquidos automatizados y con rigurosos controles de calidad (Control Calidad Externo de la OMS) [CLSI 2011; Alcaide 2005]. Aún así, para el tratamiento de aquellos enfermos con factores de riesgo para la resistencia, es fundamental disponer con rapidez de los datos de sensibilidad, ya sea para validar el tratamiento empírico inicial o para orientar el esquema terapéutico en función del patrón de resistencia detectado. Por desgracia, los resultados de las pruebas de sensibilidad fenotípicas convencionales suelen tardar varias semanas lo que supone un retraso crucial desde el punto de vista asistencial en diversas situaciones. En nuestros días existe un gran interés en el desarrollo y aplicación de estrategias moleculares para la detección rápida de la enfermedad y de la resistencia a los fármacos antituberculosos [Alcaide 2011]. Desde hace unos años se sabe que la resistencia a los agentes habitualmente utilizados en el tratamiento de la tuberculosis, se debe fundamentalmente a una modificación de los genes diana mediante una mutación cromosómica espontánea. Las mutaciones pueden surgir sin exposición previa al tratamiento o tras una presión antibiótica en el curso de tratamientos inadecuados. Muchas de estas mutaciones y su correlación con la resistencia a los diversos fármacos están bien establecidas y explicarían una gran parte del conjunto de resistencias observadas [Alcaide 2005; Alcaide 2011]. Sin embargo, a pesar de que existen algunos estudios puntuales y geográficamente concretos, y que se dispone de métodos estandarizados aprobados por la OMS [WHO 2008; WHO 2013], la distribución y frecuencia de las diversas modificaciones genéticas en España no es del todo bien conocida.

Por todo ello, para aplicar un tratamiento empírico de la tuberculosis correcto y detectar precozmente la resistencia a los fármacos, es preciso conocer en nuestro país la distribución, frecuencia y evolución de las resistencias a los fármacos

antituberculosos y sus mecanismos genéticos más implicados, que permitan desarrollar y aplicar métodos de detección rápidos adecuados a nuestro medio.

Esta tesis se divide en cuatro capítulos, basados en dos grandes bloques o partes. La primera trata en un primer capítulo de conocer en la actualidad (2016-2018) la resistencia (global, pacientes con y sin tratamiento previo) a los fármacos antituberculosos de primera y segunda línea en *M. tuberculosis* en España. Así como determinar los factores clínico-epidemiológicos implicados en la resistencia y los mecanismos moleculares más importantes relacionados con ella en nuestro medio, mediante el estudio REMOTUBES, un estudio de la SEPAR que pretende dar continuidad a un trabajo anterior (RETUBES). Además, en el segundo capítulo, se llevó a cabo un análisis evolutivo de las resistencias en tuberculosis en España en los últimos años (2006-2016).

El segundo bloque consta de dos capítulos en los que se estudian dos técnicas moleculares que pueden resultar de gran utilidad para la detección e identificación de micobacterias tuberculosas, además de presentar información sobre la resistencia a los fármacos contra la tuberculosis. Pese a que la mayoría de los casos de tuberculosis afectan a los pulmones, también hay un porcentaje importante con tuberculosis extrapulmonar cuyo diagnóstico es más difícil y tardío. Por ello, en un capítulo de esta tesis se estudia la rentabilidad global (identificación y detección de mutaciones relacionadas con la resistencia a la Rifampicina) de una de las últimas técnicas ultrasensibles de PCR a tiempo real, en muestras clínicas con baja carga bacilar (extrapulmonares) y en un área de baja incidencia de tuberculosis. Además, este segundo bloque se complementa con el estudio de otra técnica molecular reciente, una PCR multiplex que permite la detección de *M. tuberculosis* complex, y la resistencia (MDR-TB y XDR-TB) a fármacos de primera y segunda línea en el mismo ensayo, empleando muestras pertenecientes al estudio REMOTUBES.

OBJETIVOS

1. Estudio de las resistencias a los fármacos antituberculosos y los mecanismos moleculares más frecuentes en *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTUBC) en España durante el periodo 2016-2018 (Capítulo 1; Estudio REMOTUBES).

1.1. Conocer en la actualidad el porcentaje de resistencia a los fármacos antituberculosos de primera y segunda línea en MTUBC en España.

1.2. Determinar los mecanismos moleculares más importantes relacionados con la resistencia a los fármacos antituberculosos en nuestro medio.

1.3 Conocer los factores clínico-epidemiológicos implicados en la resistencia a los antimicrobianos.

2. Estudiar la evolución de las resistencias a los fármacos antituberculosos en España durante el periodo 2006-2016 (Capítulo 2).

2.1. Conocer y analizar el porcentaje de resistencia a los fármacos antituberculosos de primera y segunda línea, su tendencia y la distribución de los patrones de resistencia.

2.2. Determinar los factores demográficos, clínicos, sociales y microbiológicos asociados a la resistencia a los antimicobacterianos.

3. Evaluar la eficacia del sistema Xpert MTB/RIF Ultra para la detección simultánea de ADN de MTUBC y de la resistencia a la Rifampicina en muestras extrapulmonares con baciloscopia negativa (Capítulo 3).

4. Determinar la utilidad de la prueba Anyplex MTB/MDR/XDR para la detección rápida de mutaciones que confieren resistencia a los fármacos de primera y segunda línea en cepas de MTUBC con diferentes tipos de resistencia a los antimicobacterianos (Capítulo 4).

CAPÍTULO 1

Estudio de las resistencias a los fármacos y los mecanismos moleculares más frecuentes en *Mycobacterium tuberculosis* complex en España durante el periodo 2016-2018 (Estudio REMOTUBES)

Perez-Risco D, Alcaide F, Rodrigo T, Grupo de Trabajo REMOTUBES del PII TB. Resistencias a fármacos y mecanismos moleculares de resistencia a *Mycobacterium tuberculosis* complex en España. Datos preliminares del estudio REMOTUBES. En: 52º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). Santiago de Compostela, 13-16 de junio de 2019. Comunicación P280.



Introducción

La tuberculosis, causada por *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTUBC), es una de las diez enfermedades infecciosas que más muertes provoca en todo mundo. Esta enfermedad se transmite, principalmente, a través del aire cuando las personas contagiadas expulsan bacilos al toser, estornudar o hablar. La enfermedad afecta fundamentalmente a los pulmones, si bien es cierto que en un tercio de los casos puede afectar a otros sitios (tuberculosis extrapulmonar). Aproximadamente una cuarta parte de la población mundial está infectada por este bacilo. En el último informe de la OMS con datos de 2019, se estima que globalmente 10 millones de personas enfermaron de tuberculosis, falleciendo 1,4 millones de personas [WHO Tuberculosis Report 2020]. La aparición de resistencias a los fármacos antituberculosos y la alarmante diseminación de estas constituye uno de los mayores problemas de salud pública en el mundo. Según la OMS, se estima que en 2019 cerca de medio millón de personas mostraron resistencia a la Rifampicina (RR-TB), y de ellas el 78% presentaron tuberculosis multirresistente (MDR-TB; tuberculosis resistente al menos a la Isoniacida y a la Rifampicina). Asimismo, alrededor del 6% de los casos MDR-TB desarrollaron tuberculosis con resistencia extendida (XDR-TB; resistencia a la Isoniacida, la Rifampicina, a una fluoroquinolona y al menos un medicamento inyectable de segunda línea). Varios factores se asocian con la aparición de resistencias a los medicamentos para la tuberculosis, como son un tratamiento inadecuado por una prescripción incorrecta o el incumplimiento de este por parte del paciente. El hecho de poseer una cepa resistente puede conllevar una mayor gravedad de la enfermedad, cambios en el tratamiento (número y tipo de fármacos, y duración de este), una menor tasa de curación y una mayor probabilidad de efectos adversos. Ante la expansión de esta enfermedad y el peligro de los niveles de resistencia, la OMS está realizando un gran esfuerzo en incrementar y potenciar los programas de vigilancia continua para analizar la evolución de la tuberculosis y de la resistencia a los antimicrobianos, los movimientos migratorios y la coinfección por el VIH, y así poder establecer medidas globales para su control, rompiendo de esta manera la cadena de transmisión y reducir su impacto epidemiológico, especialmente en inmunodeprimidos.

En España, se notificaron 4.386 casos a lo largo de 2018, con una tasa de incidencia de tuberculosis de 9,4 casos por 100.000 habitantes [WHO TB Spain profile 2019]. Según datos del Centro Nacional de Microbiología, entre 2012 y 2017 se identificaron entre 20 y 30 pacientes con MDR-TB al año, la mayoría de ellos no nacidos en España. De los casos MDR-TB en 2017, 4 de ellos presentaron, además, resistencia a un fármaco inyectable de segunda línea y a una fluoroquinolona (XDR-TB), y todos eran pacientes extranjeros. En España, la tuberculosis es una enfermedad de declaración obligatoria. Sin embargo, gran parte de los datos relacionados con la sensibilidad a los fármacos antituberculosos no son del todo bien conocidos [Centro Nacional de Epidemiología 2015]. Así pues, la situación de la tuberculosis resistente en España no es fácil de precisar por el subregistro de casos y la variabilidad en la realización de las pruebas de sensibilidad en el pasado reciente. En los últimos años se han publicado diversos estudios puntuales más o menos representativos a nivel geográfico y/o temporal [Martín-Casabona 2000; Pérez del Molino Bernal 2005; Tirado Balaguer 2006; Sanz Barbero 2007; Jiménez 2008; Caylà 2009; Blanquer 2014], que pretenden dar una visión más global de la situación de esta enfermedad y su resistencia en el país, sin embargo, se observa una gran variabilidad geográfica, así como diferencias entre ellos en aspectos fundamentales en el diseño de los estudios.

La determinación de la resistencia se hace mediante métodos microbiológicos en diversas situaciones. Según el plan para la prevención y control de la tuberculosis en España, en la actualidad se garantiza la realización de los estudios de sensibilidad a los fármacos de primera línea a todos los pacientes diagnosticados de tuberculosis, con independencia de tratamiento previo. La vigilancia del grupo de pacientes que no han tenido tuberculosis anteriormente y no han recibido tratamiento antituberculoso alguno, indicará si hay cepas resistentes en la población y cómo se están diseminando en la comunidad. La segunda situación es en caso de una mala evolución del paciente y/o sospecha de una inadecuada respuesta al tratamiento (incluida la positividad o falta de negativización de los cultivos), lo cual estaría relacionado con problemas en la adherencia al tratamiento, adecuación de las pautas o esquemas terapéuticos prescritos, así como una posible mala absorción de los fármacos.

Gran parte de los laboratorios de microbiología de los hospitales de tercer nivel en España, realizan estas pruebas de sensibilidad mediante métodos estandarizados en medios líquidos automatizados y con controles de calidad permanentes, ya sean internos en el propio laboratorio o bien externos, como por ejemplo el Control de Calidad Externo de la OMS o el de la SEIMC [CLSI 2011; Alcaide 2005; Horne 2013]. Por desgracia, los resultados de las pruebas de sensibilidad fenotípicas pueden demorarse varias semanas. Por este motivo, actualmente existe un gran interés en el desarrollo y aplicación de estrategias moleculares para la detección rápida de la resistencia en los aislamientos de MTUBC [Alba Álvarez 2017; Alcaide 2011; Espasa 2005; Ruiz 2004]. El diagnóstico rápido de la enfermedad tuberculosa y la resistencia a los fármacos en MTUBC es uno de los pilares fundamentales en el control de esta enfermedad, permitiendo una acción epidemiológica y terapéutica precoz. La resistencia a los fármacos contra la tuberculosis se debe, fundamentalmente, a una modificación de los genes diana mediante una mutación cromosómica espontánea. Las mutaciones más frecuentes que confieren resistencia a la Isoniacida se localizan en el gen *katG* y en el gen *inhA*. En el primer caso suele estar relacionado con niveles elevados de resistencia y suelen ser las mutaciones más frecuentes en los aislamientos multirresistentes (MDR-TB). Sin embargo, las mutaciones en el gen *inhA*, suelen relacionarse con resistencias de bajo nivel y resistencia a la Etionamida. Por otro lado, la resistencia a la Rifampicina se relaciona con alteraciones en el gen *rpoB*, en concreto en una zona de sólo 81 pb que permite un abordaje diagnóstico fácil mediante diversos métodos moleculares actualmente disponibles. En el caso de los aminoglucósidos/polipéptidos, los genes *rpsL* y *rrs* son los más frecuentemente involucrados, así como el gen *embB* para el Etambutol, o el gen *pncA* para la Pirazinamida y los genes *gyrA* y *gyrB* en la detección de resistencia a las fluoroquinolonas. Muchas de estas mutaciones y su correlación con la resistencia a los diversos fármacos están bien establecidas y explicarían una gran parte del conjunto de resistencias observadas [Alcaide 2011; Domínguez 2016; Zhan 2020]. A pesar de que se dispone de métodos moleculares estandarizados y relativamente sencillos como el INNO-LiPA Rif.TB (Innogenetics, Ghent, Belgium), el Genotype MTBDRplus (Hain Lifescience, Nehren, Germany) o el Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, USA), y que cuentan con la aprobación de la OMS [WHO resistance policy update 2016], los mecanismos moleculares implicados en la

resistencia en tuberculosis no son del todo bien conocidos en el conjunto del territorio español y de una forma actualizada.

El objetivo del estudio REMOTUBES fue conocer, en la actualidad, la resistencia a los fármacos antituberculosos de primera y segunda línea en MTUBC en múltiples centros hospitalarios de España, así como los mecanismos moleculares relacionados con la misma, y determinar qué factores clínico-epidemiológicos pueden estar asociados a la resistencia en nuestro país.

Materiales y métodos

Diseño del estudio

Estudio prospectivo observacional, de carácter multicéntrico y de 3 años de duración, iniciado el 1 de enero del 2016 hasta el 31 de diciembre de 2018. Este estudio forma parte del Programa Integrado de investigación en Tuberculosis (PII-TB) de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR; proyecto 128-2014).

Los criterios de inclusión de los pacientes fueron los siguientes: 1) Disponer del consentimiento informado del paciente o de los padres/tutores en caso de ser menor de edad; 2) Diagnóstico de tuberculosis pulmonar y/o extrapulmonar; 3) Saber si ha recibido o no tratamiento antituberculoso previamente; 4) Tener, al menos, un aislamiento de *M. tuberculosis* complex; 5) Disponer del estudio de sensibilidad fenotípico a los fármacos antituberculosos de primera y segunda línea (ante resistencia a los de primera) en el propio centro u otro de referencia.

Recogida y análisis de los datos

Los datos obtenidos (clínicos-epidemiológicos y microbiológicos) se introdujeron en una aplicación telemática de la SEPAR disponible para todos los investigadores. Esta base informática se adaptó para el estudio REMOTUBES.

Las variables socio-demográficas analizadas fueron: edad, sexo, país de nacimiento, convivencia y hábitos tóxicos (tabaco, alcohol y/o drogas). También se contemplaron los antecedentes personales (tuberculosis previa, coinfección con VIH u otras inmunodepresiones) y datos clínicos como la localización principal de la enfermedad tuberculosa (pulmonar o extrapulmonar). Además, se analizaron los

resultados del estudio de sensibilidad a los principales fármacos antituberculosos de primera línea: Isoniacida, Rifampicina, Etambutol, Estreptomina y Pirazinamida. También se realizó el estudio de los fármacos de segunda línea (ante resistencia a los de primera): Amikacina, Capreomicina, Levofloxacino, Ofloxacino, Moxifloxacino, Linezolid, Etionamida y Kanamicina. De igual modo, también constan los datos relativos a la evolución del paciente, pudiendo tener un resultado del tratamiento satisfactorio (curación) o no satisfactorio (abandono, fracaso terapéutico, traslado, pérdida del paciente o fallecimiento).

Según la edad de los pacientes se establecieron diversos grupos. Así, los pacientes menores de edad (<18 años) se categorizaron como menores, jóvenes si su edad estaba entre 18 y 30 años, adultos si estaban entre 31 y 50 años, y mayores si sobrepasaban los 50 años. La resistencia a un solo fármaco se consideró como monorresistencia, mientras que la resistencia conjunta a la Rifampicina e Isoniacida, esta se clasificó como multirresistencia (MDR-TB). En los casos que, al menos, hubo resistencia conjunta a la Isoniacida, Rifampicina, una fluoroquinolona y un medicamento inyectable de segunda línea se clasificó como resistencia extendida (XDR-TB).

Estudio microbiológico

Las muestras no estériles fueron pre-tratadas siguiendo el protocolo de digestión-descontaminación desarrollado por Kubica *et al.* [Kubica 1963], mientras que las muestras estériles se procesaron directamente. A todas ellas se les realizó un examen microscópico (tinción Auramina y/o Ziehl-Neelsen) y cultivo en medio líquido y sólido. Parte del volumen restante se congeló para estudios posteriores.

Los estudios de sensibilidad a los fármacos de primera y segunda línea se realizaron mediante los métodos estándar recomendados por varias organizaciones y sociedades científicas, como la OMS, CLSI, SEIMC o los CDC. Dichos estudios se basaron en el método modificado de las proporciones múltiples en medio líquido mediante los sistemas automatizados BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, EEUU) y VersaTrek (TREK Diagnostics, EEUU). Las concentraciones críticas de los fármacos antituberculosos (puntos de corte) representan las concentraciones más bajas de los diferentes fármacos que inhiben el crecimiento de las cepas sensibles de MTUBC, que

nunca han estado expuestas a los mismos, y no inhiben a las cepas resistentes a cada antimicrobiano específico (cepas resistentes). Sin bien la detección de MDR-TB no suele comportar problema alguno, existen algunas discrepancias interlaboratorios con la Estreptomicina, el Etambutol y la Pirazinamida. Estas concentraciones críticas son la referencia que permite interpretar los resultados de las pruebas de sensibilidad de los fármacos antituberculosos de primera línea, y que para el MGIT 960, la OMS recomienda en la actualidad las siguientes: 0,1 µg/ml para la Isoniacida, 1 µg/ml para la Rifampicina, 5 µg/ml para el Etambutol, 1 µg/ml para la Estreptomicina, y 100 µg/ml para la Pirazinamida. Para el sistema VersaTrek en los fármacos de primera línea, estas son: 0,1 µg/ml para la Isoniacida, 1 µg/ml para Rifampicina, 5 µg/ml para Etambutol, 2 µg/ml para Estreptomicina, y 300 µg/ml para la Pirazinamida [VersaTrek Myco, Streptomycin, PZA 2010]. Por otro lado, también fue posible analizar las concentraciones críticas en los fármacos de segunda línea. En el caso de resistencia a la rifampicina y/o dos fármacos de primera línea deberían realizarse pruebas de sensibilidad a los fármacos de segunda línea. Las concentraciones críticas propuestas por la OMS para estos fármacos con el método MGIT960 son: 1 µg/ml para la Amikacina, 2,5 µg/ml para la Capreomicina, 5 µg/ml para la Etionamida, 1 µg/ml para el Levofloxacino, 1 µg/ml para el Linezolid, 0,25 µg/ml para el Moxifloxacino (aunque 1 µg/ml es el punto de corte clínico propuesto), 1 µg/ml para la Clofazimina y 0,5 µg/ml para la Rifabutina. Para otros fármacos no están totalmente establecidas las concentraciones críticas con este método en medio líquido (MGIT960) y así se suelen aplicar equivalencias de otros métodos y medios. En el caso de la Kanamicina se utiliza la concentración de 2,5 µg/ml [Schön 2020], mientras que para el Ácido Paraminosalicílico se ha sugerido 4 µg/ml. En el caso de la Cicloserina, suele ser más complejo y se suele aplicar su equivalencia con el método de las proporciones (en Löwenstein-Jensen), que sería de 40 µg/ml. Para los nuevos fármacos como la Bedaquilina y el Delamanid se han propuesto algunos puntos de corte para este método del MGIT960: 1 µg/ml para la Bedaquilina y 0,06 µg/ml para el Delamanid [WHO CC DST 2018; Schön 2020].

Los mecanismos de resistencia molecular se estudiaron para aquellos aislamientos que presentaron resistencia a algún fármaco antituberculoso de primera línea. Para

ello se emplearon técnicas comerciales como el GenoType MTBDR*plus*/MTBDR*sl* (Hain Lifescience, Nehren, Germany), que se basa en la amplificación de zonas concretas del ADN micobacteriano, junto con una hibridación reversa sobre tiras de nitrocelulosa que contienen las sondas correspondientes a secuencias naturales no mutadas (*wild type*) y secuencias con los codones más frecuentemente alterados para la Rifampicina y la Isoniacida. El GenoType MTBDR*plus* estudia las dianas más importantes y frecuentes relacionadas con la resistencia a la Rifampicina e Isoniacida. Este contiene sondas del genotipo “salvaje” no mutado (*wild type*) de los genes implicados, de modo que si hibridan (y, por lo tanto, son positivas) no se detectan mutaciones en las regiones examinadas y la cepa estudiada sería sensible para el respectivo antimicrobiano. También poseen sondas de las mutaciones más frecuentes de estos genes implicadas en la resistencia a los fármacos estudiados. En total, este sistema comercial permite detectar hasta 28 mutaciones en el gen *rpoB* (F505L, T508A, S509T, E510H, L511P, Q513L, Q513P, del514-516, D516V, D516Y, del515, del518, N518I, S522L, S522Q, H526Y, H526D, H526R, H526P, H526Q, H526N, H526L, H526S, H526C, S531L, S531Q, S531W, L533P), dos en *katG* (S315T1 y S315T2) y cuatro mutaciones en *inhA* (C15T, A16G, T8C, T8A). Por otro lado, el GenoType MTBDR*sl* (versión 1 y 2) permite estudiar la sensibilidad a los fármacos antituberculosos de segunda línea. La versión inicial permite detectar nueve mutaciones en el gen *gyrA* relacionadas con la resistencia a las fluoroquinolonas (C88S, A88T, A90V, S91P, D94A, D94N, D94Y, D94G, D94H), tres mutaciones en el gen *rrs* de los inyectables de segunda línea (A1401G, C1402T, G1484T), y tres en el gen *embB* para el Etambutol (M306I ATG→ATA, M306V, M306I ATG→ATC/ATT). En cambio, la versión 2 permite detectar nueve mutaciones en el gen *gyrA* (G88A, G88C, A90V, S91P, D94A, D94N, D94Y, D94G, D94H) y dos en *gyrB* (N538D, E540V) para las fluoroquinolonas, tres en el gen *rrs* de los inyectables de segunda línea (A1401G, C1402T, G1484T), y cinco en el gen *eis* en relación con la Kanamicina (G37T, C14T, C12T, G10A, C2A).

Otra técnica comercial que se utilizó en el estudio fue el Anyplex MDR-TB/XDR-TB (Seegene, Inc., Seoul, South Korea), basado en una amplificación del material genético micobacteriano en tiempo real (RT-PCR). Los fármacos y las dianas (mutaciones más significativas) que se analizaron con este sistema fueron el gen *katG* y la región

promotora del gen *inhA* para la Isoniacida (abarca siete mutaciones: C15T, T8A, T8C, S315I, S315N, S315T1, S315T2), el gen *rpoB* para la Rifampicina (identifica hasta 18 mutaciones: L511P, Q513K, Q513L, Q513P, D516V, D516Y, S522L, S522Q, H526C, H526D, H526L, H526N, H526R, H526Y, S531L, S531W, L533P y delección de tres aminoácidos entre los codones 513 y 516), el gen *gyrA* para las fluoroquinolonas (permite detectar hasta siete mutaciones: A90V, S91P, D94A, D94G, D94H, D94N, D94Y), y los genes *rrs* y *eis* para los inyectables de segunda línea y la Kanamicina (contempla un total de seis mutaciones: 1401, 1402, 1484, G37T, C14T, G10A), respectivamente. Los estudios moleculares, ya fuesen con el GenoType o bien con el Anyplex, fueron llevados a cabo por cada laboratorio de los centros participantes dentro de su rutina habitual, y en aquellos casos que no se pudo hacer, los estudios se realizaron en el centro coordinador del estudio REMOTUBES (Laboratorio de Micobacterias del Hospital Universitari de Bellvitge).

En caso de discrepancia entre los resultados de las técnicas moleculares de PCR e hibridación reversa, se realizó la secuenciación de la diana genética concreta.

Análisis estadístico

Se realizaron análisis univariados sobre los posibles factores asociados con la presencia de la enfermedad clínica, determinando el *odds ratio* (OR) y los intervalos de confianza del 95% (IC). Las diferencias estadísticamente significativas se definieron como $p < 0.05$ utilizando la prueba de ji cuadrado (distribución de Pearson) y el test exacto de Fisher.

Aspectos éticos

El proyecto fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitari de Bellvitge y por los CEIC de los hospitales participantes en este trabajo. El estudio se llevó a cabo de acuerdo con los requerimientos expresados en la Declaración de Helsinki (revisión de Tokio, octubre de 2004) y la Ley Orgánica Española de Protección de Datos 15/1999. El consentimiento informado fue obtenido de todos los pacientes incluidos en el estudio REMOTUBES (ver hoja de consentimiento informado del Anexo al final de esta memoria).

Resultados

Distribución geográfica y características socio-demográficas

Se incluyeron 930 pacientes a lo largo del periodo de estudio (2016-2018), todos con el resultado de las pruebas de sensibilidad a los fármacos antituberculosos de primera línea, y pertenecientes a 22 centros hospitalarios del territorio nacional de 10 CC.AA. diferentes (Figura 9). La distribución geográfica de los centros fue la siguiente: Andalucía (Hospital Universitario Virgen Macarena, Hospital Universitario Virgen del Rocío, y Hospital Universitario de Jerez de la Frontera), Aragón (Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa), Asturias (Hospital Universitario Central de Asturias, Hospital Universitario de Cabueñes y Hospital San Agustín), Canarias (Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín), Cataluña (Hospital de Sant Joan Despí Moisès Broggi, Hospital General del Parc Sanitari Sant Joan de Déu, Serveis Clínics, Hospital Universitari Vall d'Hebrón, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Hospital Universitari de Bellvitge y Hospital del Mar), Galicia (Complejo Hospitalario de Pontevedra y Hospital de Calde), Islas Baleares (Hospital Son Llàtzer), Comunidad de Madrid (Complejo Hospitalario La Paz-Cantoblanco-Carlos III y Hospital General universitario Gregorio Marañón), Comunidad Valenciana (Hospital General universitario de Valencia) y País Vasco (Hospital de Santa Marina y Hospital de Cruces).

Cataluña, con un mayor número de centros participantes, fue la comunidad autónoma en la que se registraron más casos de pacientes enfermos de tuberculosis, (39,9%). A continuación, le siguieron Andalucía (13,1%), Galicia (11,5%) y Asturias (10,6%). Las características socio-demográficas y clínicas analizadas están descritas en la Tabla 3 y 4, respectivamente.

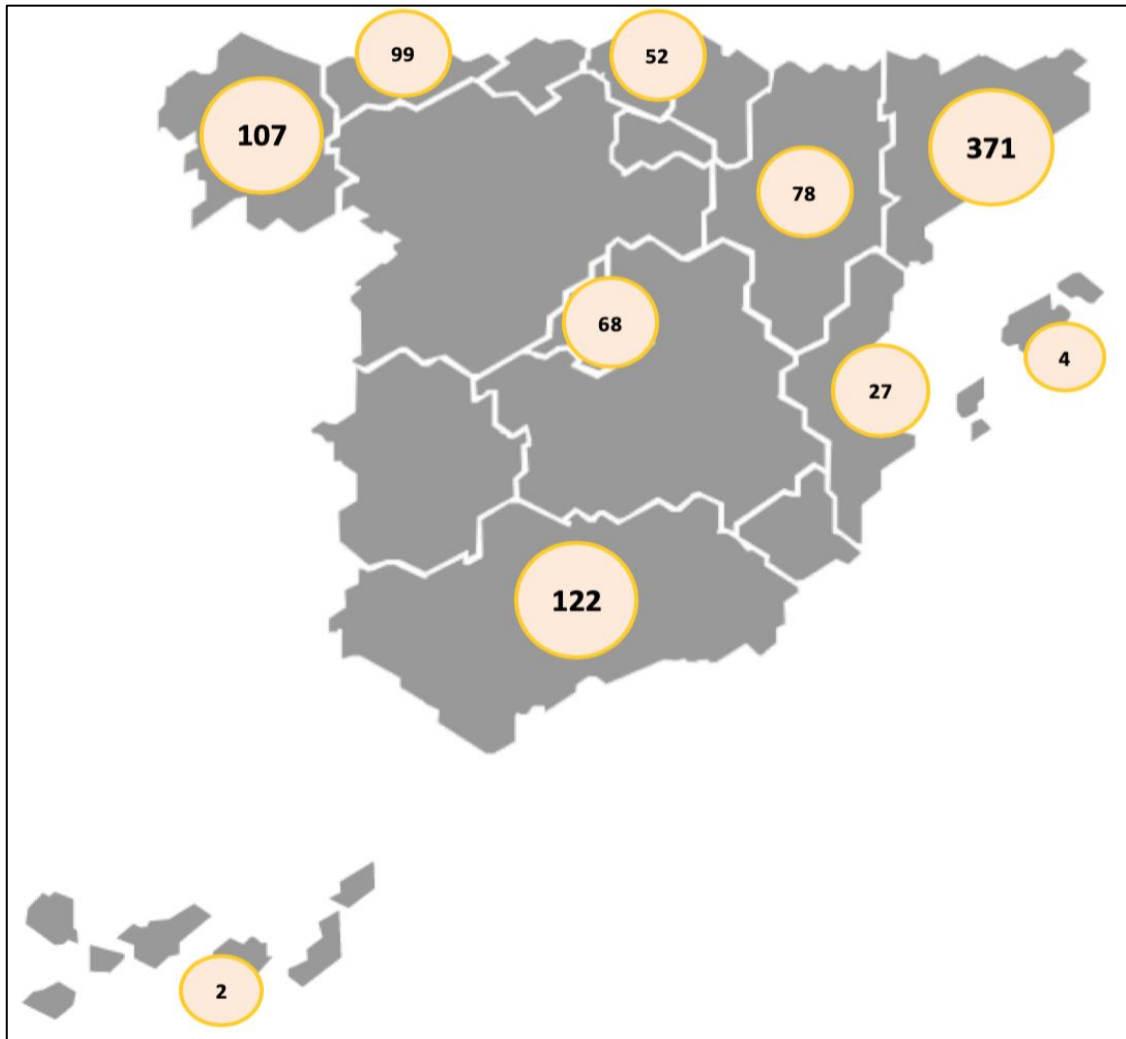


Figura 9. Distribución geográfica en España, por CCAA, de los 930 casos analizados (2016-2018).

Resistencia a los fármacos y mecanismos moleculares de resistencia

El estudio de sensibilidad fenotípico mostró que 122 (13,1%) pacientes presentaron resistencia a algún fármaco de primera línea (Tabla 5), siendo 67 (7,2%) casos los que presentaron resistencia a la Isoniacida, 25 (2,7%) a la Rifampicina, 58 (6,2%) a la Estreptomicina, 11 (1,2%) al Etambutol y 38 (4,1%) a la Pirazinamida. De ellos, 21 (2,3%) casos fueron MDR-TB. En cuanto a las pruebas de sensibilidad para los fármacos de segunda línea, estas se realizaron en 105/122 casos, siendo 15 (14,6%) pacientes resistentes a la Etionamida, ocho (7,8%) a la Rifabutina, cinco (4,8%) al Levofloxacino, cuatro (3,9%) al Linezolid, tres (2,9%) a la Capreomicina, tres (2,9%) a la Kanamicina, dos (1,9%) a la Amikacina, uno (0,1%) a la Cicloserina, y uno (0,1%) al Moxifloxacino. Del total, se detectó un caso XDR-TB (0,1%).

Tabla 3. Características socio-demográficas de los pacientes del estudio REMOTUBES (N=930).

Características	N	%
Sexo		
Hombre	684	73,5
Mujer	246	26,5
Edad (años)		
0-17	15	1,6
18-30	169	18,2
31-50	361	38,1
>50	385	42,1
Procedencia		
Nativo	601	64,6
Extranjero	329	35,4
Convivencia		
Familia	679	73,0
Vive solo	109	11,7
Grupo	75	8,1
Indigente	41	4,4
Prisión	26	2,8
Consumo tabaco		
No fumador	415	44,6
Fumador	372	40,0
Ex-Fumador	143	15,4
Consumo de alcohol		
No	634	68,2
Sí	296	31,8
Consumo de drogas		
No	861	92,6
Sí	69	7,4

Tabla 4. Características clínicas de los pacientes del estudio REMOTUBES (N=930).

Características	N	%
<i>Infección por VIH</i>		
No	890	95,7
Sí	40	4,3
<i>Otras inmunosupresiones</i>		
No	822	88,4
Sí	108	11,6
<i>Tratamiento antituberculoso previo</i>		
No	869	93,4
Sí	61	6,6
<i>Localización principal</i>		
Pulmonar	744	80,0
Extrapulmonar	186	20,0
<i>Síntomas clínicos</i>		
Tos (Sí)	546	58,7
Pérdida de peso (Sí)	401	43,1
Expectoración (Sí)	341	36,7
Fiebre (Sí)	339	36,5
Hemoptisis (Sí)	107	11,5
<i>Prueba de la tuberculina</i>		
Negativa	291	31,3
Positiva	128	13,8
No realizada	511	54,9
<i>IGRA</i>		
Negativa	542	58,3
Positiva	216	23,2
No realizada	172	18,5
<i>Radiografía del tórax</i>		
Afectación no cavitaria	490	52,7
Afectación cavitaria	312	33,6
Normal	122	13,1
No realizada	6	0,6

Tabla 5. Resistencia a los fármacos antituberculosos en el estudio REMOTUBES según el tipo de resistencia (N=930).

Fármacos	N (%)	Sin tratamiento Previo (N=869)	Con tratamiento Previo (N=61)
Uno o más	122 (13,1)	109	13
H	67 (7,2)	58	11
H solo	28 (3,0)	28	0
MDR (H + R)	21 (2,3)	13	8
MDR + S	13 (1,4)	7	6
R	25 (2,7)	17	8
S	58 (6,2)	48	10
S solo	24 (2,6)	23	1
H + S	29 (3,1)	21	8
Pirazinamida	38 (4,1)	30	8
Etambutol	11 (1,2)	6	5
Fluoroquinolonas	6 (0,6)	4	2
Inyectables Segunda Línea	7 (0,8)	3	4
XDR	1 (0,1)	0	1

H: Isoniacida; MDR: resistencia conjunta a la Isoniacida y a la Rifampicina; R: Rifampicina; S: Estreptomicina; XDR: resistencia al menos a la Isoniacida, Rifampicina, una Fluoroquinolona y un medicamento Inyectable de Segunda Línea

En lo que respecta a la distribución geográfica de los 122 casos de tuberculosis con alguna resistencia a los antimicrobianos (Figura 10), el 50,8% se declararon en Cataluña, seguidos por el 17,2% que se declararon en los centros hospitalarios de Andalucía y el 9,8% de los de Galicia.

El estudio de los mecanismos moleculares de resistencia mostró que, de los 67 pacientes que presentaron resistencia a la Isoniacida, 37 (55,2%) de ellos tenían mutaciones en el gen *katG*, 21 (31,3%) en el gen *inhA*, y en un caso se detectaron mutaciones en ambos genes. En los ocho casos restantes, las técnicas moleculares empleadas no detectaron ninguna mutación en *katG* ni en *inhA*. Todas las mutaciones en el gen *katG* (correlacionadas con resistencia de alto nivel) se localizaron en el codón 315 (mutación S315T), mientras que en el gen *inhA* (correlacionadas con resistencia de bajo nivel) las alteraciones más frecuentes se encontraron en el codón 15 (C15T en el 79,9%). En el caso de la Rifampicina, todos los aislamientos resistentes presentaron mutaciones en el gen *rpoB*, y más concretamente en el codón 531 (76%). En los 11

pacientes con resistencia fenotípica al Etambutol, uno (9,1%) presentó una mutación en el gen *embB* (M306I), que está asociada a un elevado nivel de resistencia. En cuanto a la Estreptomicina, una (1,7%) cepa presentó mutación en el gen *rrs* (en C491T). Para las fluoroquinolonas, cuatro (67%) de los seis casos revelaron alteraciones en el gen *gyrA*. Entre los siete casos fenotípicamente resistentes a algún fármaco inyectable de segunda línea (aminoglucósidos y péptidos cíclicos), el estudio de los mecanismos moleculares de resistencia mostró que dos (28,6%) casos presentaron mutación en el gen *rrs* y uno (14,3%) caso presentaba una mutación en el gen *eis* (resistencia a la Kanamicina de bajo nivel). En la Tabla 6 se muestran con detalle las posiciones y el tipo de mutaciones identificadas mediante los métodos moleculares utilizados en los genes *rpoB* para la Rifampicina, y *katG* e *inhA* para la Isoniacida.

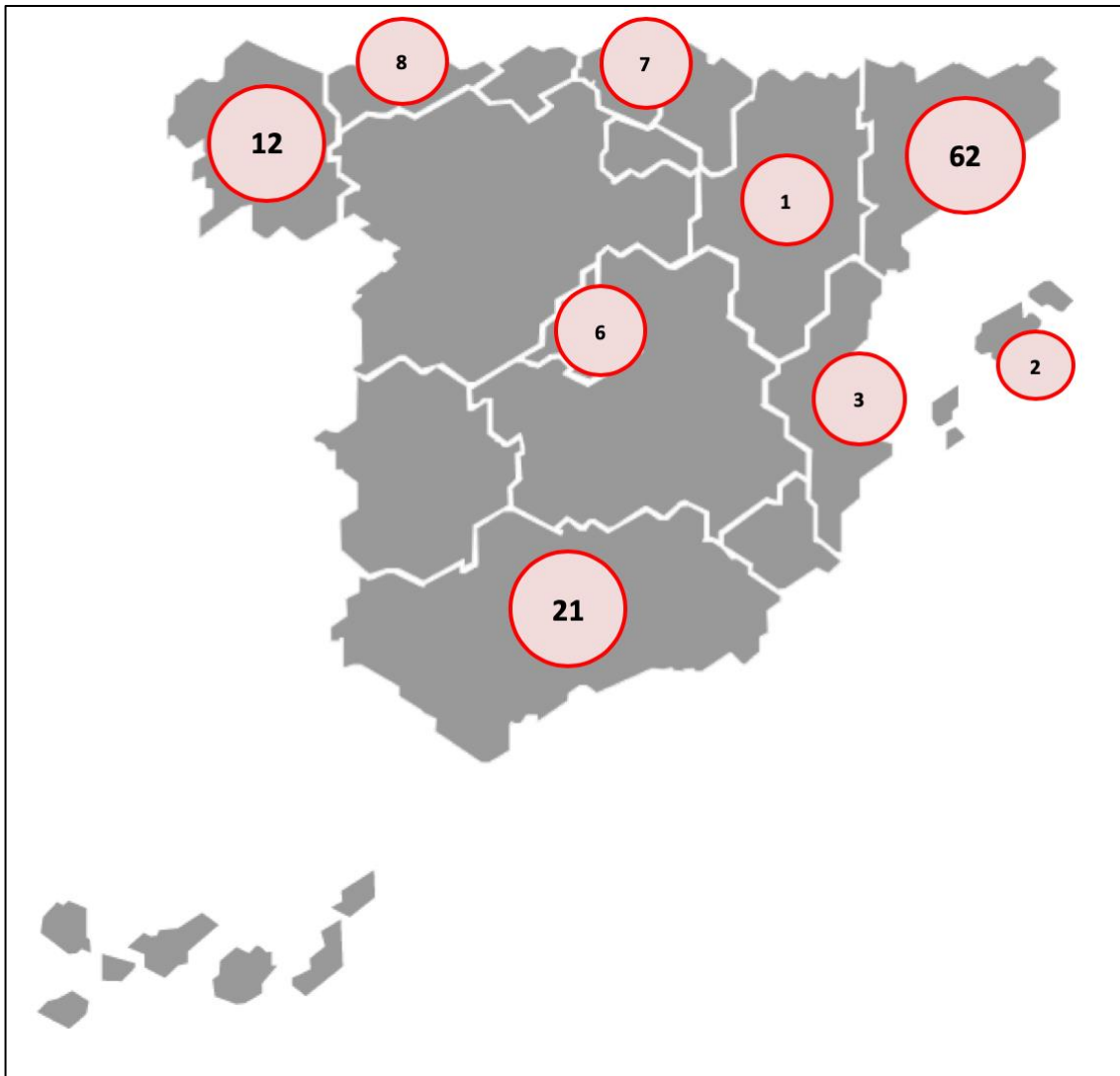


Figura 10. Distribución geográfica en España, por CCAA, de los 122 casos de tuberculosis que presentaron resistencia a algún fármaco antituberculoso de primera línea.

Tabla 6. Lista de las mutaciones identificadas por GenoType MTBDR*plus* y Anyplex MTB/MDR/XDR en los genes *rpoB*, *katG* e *inhA* en la población con resistencia a algún fármaco antituberculoso de primera línea (N=122).

Gen	Posición	Tipo de mutación	Cambio Aminoácido	Número de muestras
<i>rpoB</i>	516	GAC/GAU → GUA/GUG/GUC/GUU	Asp/Val	1
	526	CAC/CAU → UAC/UAU	His/Tyr	3
	526	CAC/CAU → GAC/GAU	His/Asp	2
	531	UCA/UCC/UCG/UCU/AGC/AGU → CUA/CUC/CUG/CUU/UUA/UUG	Ser/Leu	19
<i>katG</i>	315	UCA/UCC/UCG/UCU/AGC/AGU → ACA/ACC/ACG/ACU	Ser/Thr	38
	15	UGC/UGU → ACA/ACC/ACG/ACU	Cys/Thr	20
<i>inhA</i>	94	UCA/UCC/UCG/UCU/AGC/AGU → GCA/GCC/GCG/GCU	Ser/Ala	2

Resistencias cruzadas

Cuando se analizaron los casos resistentes a la Isoniacida y a su vez resistentes a la Etionamida, se observó que la mutación C-15T en el gen *inhA* fue la más frecuente, representando un 56,3% de los casos (9/16). En cuanto al grupo de las rifamicinas, en este estudio REMOTUBES 25 pacientes mostraron resistencia a la Rifampicina. De ellos, en 19 casos también lo fueron a la Rifabutina, lo que supuso un nivel de resistencia cruzada del 76%. Por otro lado, de los tres casos que presentaron resistencia a la Capreomicina, uno (33,4%) también fue resistente a la Amikacina. De los dos casos totales resistentes a la Amikacina, estos también lo fueron a la Estreptomicina.

MDR-TB y factores de riesgo

Los datos relativos a la asociación de las características socio-demográficas estudiadas con la presencia de multirresistencia se reflejan en la Tabla 7. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el hecho de tener MDR-TB y la procedencia del paciente, el estar infectado por el VIH y también el haber recibido tratamiento para la tuberculosis con anterioridad.

Tabla 7. Factores de riesgo asociados a la tuberculosis multirresistente (MDR-TB).

Variable	MDR, n (%) (N=21)	No MDR, n (%) (N=909)	OR (95% IC)	Valor p
Sexo				
Hombre	16 (76,2)	668 (73,5)	Referencia	
Mujer	5 (23,8)	241 (26,5)	0,87 (0,32-2,39)	0,781
Edad (años)				
0-17	1 (4,8)	14 (1,5)	Referencia	
18-30	4 (19)	165 (18,2)	0,34 (0,04-3,25)	0,348
31-50	12 (57,2)	349 (38,4)	0,48 (0,06-3,97)	0,497
>50	4 (19)	381 (41,9)	0,14 (0,15-1,40)	0,096
Procedencia				
Nativo	5 (23,8)	596 (65,6)	Referencia	
Extranjero	16 (76,2)	313 (34,4)	6,09 (2,21-16,78)	<0,05
Convivencia				
Familia	13 (61,9)	666 (73,3)	Referencia	
Vive solo	2 (9,5)	107 (11,8)	0,95 (0,21-4,30)	0,954
Grupo	3 (14,3)	72 (7,9)	2,13 (0,59-7,66)	0,245
Indigente	2 (9,5)	39 (4,3)	2,62 (0,57-12,05)	0,213
Prisión	1 (4,8)	25 (2,7)	2,04 (0,25-16,28)	0,497
Consumo tabaco				
No fumador	12 (57,2)	403 (44,3)	Referencia	
Fumador	7 (33,3)	365 (40,2)	0,64 (0,25-1,65)	0,360
Ex-Fumador	2 (9,5)	141 (15,5)	0,47 (0,10-2,15)	0,335
Alcohol				
No	15 (71,4)	619 (68,1)	Referencia	
Sí	6 (28,6)	290 (31,9)	0,85 (0,32-2,22)	0,746
Drogas				
No	19 (90,5)	842 (92,6)	Referencia	
Sí	2 (9,5)	67 (7,4)	1,32 (0,30-5,80)	0,710
VIH				
No	18 (85,7)	872 (95,9)	Referencia	
Sí	3 (14,3)	37 (4,1)	3,92 (1,10-13,92)	<0,05
Otras inmunosupresiones				
No	20 (95,2)	802 (88,2)	Referencia	
Sí	1 (4,8)	107 (11,8)	0,37 (0,05-2,82)	0,340
Tratamiento previo				
No	13 (61,9)	856 (94,2)	Referencia	
Sí	8 (38,1)	53 (5,8)	9,93 (3,94-25,02)	<0,05
Localización principal				
Pulmonar	19 (90,5)	725 (79,8)	Referencia	
Extrapulmonar	2 (9,5)	184 (20,2)	0,41 (0,09-1,79)	0,239

MDR: casos multirresistentes; OR: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

Resistencia primaria o inicial (sin tratamiento previo) y secundaria o adquirida (con tratamiento previo)

En todos los casos fue posible conocer el antecedente de tratamiento antituberculoso previo: 869 (93,4%) casos no habían recibido fármacos contra la tuberculosis, mientras que 61 (6,6%) pacientes sí habían sido tratados con anterioridad (Tabla 8). De entre los 21 casos con MDR-TB, ocho (38,1%) habían recibido tratamiento previamente, igual que el único caso XDR-TB.

Tabla 8. Casos con resistencia a la Isoniacida y casos MDR-TB en función de si recibieron o no tratamiento previo, y según el país de origen de los pacientes (N=930).

Pacientes	Total N (%)	Nativos N (%)	Extranjeros N (%)	Valor p
Pacientes STP	869	564	305	
Sensibles	760 (87,5)	507 (89,9)	253 (83,0)	Referencia
Resistentes	109 (12,5)	57 (10,1)	52 (17,0)	<0,05
Resistencia a la H	56 (6,4)	32 (5,7)	24 (7,9)	0,247
MDR	13 (1,5)	4 (0,7)	9 (3,0)	<0,05
Mutación en <i>katG</i>	9 (2,2)	3 (0,5)	7 (2,3)	<0,05
Mutación en <i>inhA</i>	2 (0,2)	0	2 (0,7)	0,122
Pacientes CTP	61	37	24	
Sensibles	48 (78,7)	31 (83,8)	17 (70,8)	Referencia
Resistentes	13 (21,3)	6 (16,2)	7 (29,2)	0,337
Resistencia a la H	11 (18,0)	4 (10,8)	7 (29,2)	0,092
MDR	8 (13,1)	1 (2,7)	7 (29,2)	<0,05
Mutación en <i>katG</i>	6 (9,8)	1 (2,7)	4 (16,7)	<0,05
Mutación en <i>inhA</i>	2 (3,3)	0	2 (8,3)	0,150
Total Pacientes	930	601	329	
Sensibles	808 (86,9)	538 (89,5)	270 (82,1)	Referencia
Resistentes	122 (13,1)	63 (10,5)	59 (17,9)	<0,05
Resistencia a la H	67 (7,2)	36 (6,0)	31 (9,4)	0,063
MDR	21 (2,3)	5 (0,8)	16 (4,9)	<0,05
Mutación en <i>katG</i>	15 (1,6)	4 (0,7)	11 (3,3)	<0,05
Mutación en <i>inhA</i>	4 (0,4)	0	4 (1,2)	<0,05

STP: Sin tratamiento antituberculoso previo; CTP: Con tratamiento antituberculoso previo; H: Isoniacida; R: Rifampicina; MDR: resistencia múltiple, al menos, a la H y R.

Resultado del tratamiento

De los 930 pacientes analizados, un total de 243 (26,1%) tuvieron que prolongar su tratamiento más tiempo por la aparición de resistencias (41,6%; 101/243), toxicidad (39,5%; 96/243), incumplimiento de la terapia farmacológica (15,6%; 38/243) o interacción con otra medicación (3,3%; 8/243). De ellos, el 73,6% (179/243) tuvieron un resultado final satisfactorio, es decir, tratamiento completado y curación del paciente. Por otro lado, de entre los 243 casos en los que se prolongó el tratamiento, en 53 (21,8%) de ellos fue necesario modificar la pauta terapéutica, conllevando la adición de diversos antimicrobianos (Moxifloxacino, Linezolid y Etambutol, especialmente), la prolongación del uso de la Rifampicina y la Isoniacida, o la supresión de fármacos como la Pirazinamida por toxicidad cutánea. En cuanto a los 687 pacientes restantes que no tuvieron que prolongar la terapia farmacológica, el resultado del tratamiento se dividió en satisfactorio (tratamiento completado y curación del paciente) y en no satisfactorio (abandono, fracaso terapéutico, traslado, pérdida del paciente o fallecimiento) que representaron el 88,1% (605/687) y el 11,9% (82/687), respectivamente.

En cuanto a los 21 casos con MDR-TB, en 10 (47,6%) pacientes se optó por el uso de cuatro fármacos antituberculosos, mientras que en los 11 restantes se utilizaron otros tratamientos, si bien en ningún caso este fue de tres antimicrobianos. De los pacientes multirresistentes tratados con cuatro fármacos, la evolución y el resultado final fue satisfactorio en cuatro (40%) de ellos, mientras que en otros cuatro pacientes el tratamiento se tuvo que prolongar, y en los dos casos restantes no se pudo valorar ya que se perdió el seguimiento por traslado de los pacientes. En los casos en quienes se utilizaron otros tratamientos, su resultado final fue satisfactorio en tres (27,3%) de ellos, se prolongaron en cuatro (36,4%), y en otros cuatro se perdió el seguimiento del paciente: en tres debido a su traslado a otro centro o residencia, y en otro caso por fallecimiento del mismo.

Discusión

Los datos obtenidos en el estudio REMOTUBES constatan, en líneas generales, unos niveles bajos de resistencia a los fármacos contra la tuberculosis (Tabla 8) en España. No obstante, se aprecia un ligero incremento de casos resistentes en comparación a estudios anteriores realizados en el país dónde se detectó un 9% de los casos estudiados [Caylà 2009; Blanquer 2014]. Sin embargo, este discreto incremento no implicó un mayor número de pacientes con MDR-TB, puesto que estos niveles se mantienen estables respecto a los estudios previos en España [Blanquer 2014], así como con los datos del Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades [ECDC 2019]. Es importante remarcar que este organismo internacional sigue situando a España, en lo referente a niveles de multirresistencia, por debajo de la media de la Unión Europea (2% en España frente al 3,8% de Europa). En este trabajo se ha detectado un caso de XDR-TB, tal y como sucedió en otro estudio anterior de características similares [García-García 2011], mientras que en el último informe del ECDC [ECDC 2019] no se notificó caso alguno. Probablemente esta subnotificación podría solventarse llevando a cabo el estudio de sensibilidad a los fármacos de segunda línea a todos los pacientes con MDR-TB, e implementar su notificación en los sistemas de vigilancia correspondientes.

En cuanto a la Isoniacida, los métodos fenotípicos mostraron una resistencia global a este fármaco del 7,2%, similares a los obtenidos por Blanquer *et al.* entre 2010 y 2011 [Blanquer 2014]. Y al igual que ese estudio, la resistencia a la Isoniacida fue más frecuente en pacientes que recibieron tratamiento previo para la tuberculosis (18%) respecto a los que no (6,4%), y en extranjeros respecto a los que nacieron en España (9,4% y 6%, respectivamente). El análisis de los mecanismos de resistencia mostró que de los pacientes con tuberculosis resistente a la Isoniacida, el 55,2% de ellos presentaban mutaciones en el gen *katG*, porcentaje similar a lo descrito por otros autores, y el 69,2% de los resistentes a la Isoniacida con una CIM >1 µg/ml mostraron mutaciones en este gen, corroborando así su asociación con niveles altos de resistencia fenotípica. Por otro lado, un tercio (31,3%) de los pacientes que fueron resistentes a la Isoniacida presentaron mutaciones en el gen *inhA* (la mayoría de ellos asociados con resistencia fenotípica de bajo nivel, debido a que el 86,4% tuvieron una

CIM <1 µg/ml). Para ellos, dosis altas de la Isoniacida podrían, tal vez, ser de utilidad terapéutica. Sin embargo, es importante tener en cuenta la posibilidad de resistencia cruzada entre la resistencia a la Isoniacida de bajo nivel y la Etionamida (ambos inhiben la síntesis de ácidos micólicos), como informaron Schaaf *et al.* en Sudáfrica y Vadwai *et al.* en India [Schaaf 2009; Vadwai 2013], puesto que en el estudio REMOTUBES, el 36,4% de los casos resistentes a la Isoniacida presentaron resistencia cruzada a la Etionamida.

La relación del gen *katG* con la multirresistencia, ya bien descrita, se observa mejor en los casos MDR-TB del estudio, donde este gen se encontró mutado en gran parte de los casos MDR (71,4%). Estas proporciones parecen mantenerse y no ir a más, estando en consonancia con trabajos anteriores. De modo similar ha sucedido con la proporción de casos MDR-TB con el gen *inhA* alterado, la cual se mantiene en niveles similares (menos del 20%) tal y como ha descrito previamente Campbell *et al* en 2011 [Campbell 2011]. La mutación más común en este gen sigue siendo en C15T, como también se constató en estudios previos en España [Pérez Del Molino 2016].

Respecto a los 25 pacientes con resistencia a la Rifampicina, 17/869 (1,96%) no habían sido tratados previamente, mientras que 8/61 (13,1%) sí lo habían sido. Estos datos están por debajo de los notificados para nuestro país por la OMS (4,2% y 18%, respectivamente) en su informe de 2019 y que corresponden a 2015 [WHO Tuberculosis Report 2019]. Pero, si se tienen en cuenta los 25 casos resistentes a la Rifampicina, se observa que 21 (84%) de ellos son MDR-TB, un porcentaje similar al informado por la OMS [WHO Tuberculosis Report 2019] a nivel mundial (78%) y alejado del elevado porcentaje de otros estudios en España [Caminero 2013] dónde se afirma que entre el 90-95% de los casos con resistencia a la Rifampicina eran MDR-TB. Sin embargo, a pesar de la disminución de MDR dentro de los RR, en nuestro medio en la actualidad, la resistencia a la Rifampicina continúa siendo un marcador importante de MDR-TB. Con todo, la detección de resistencia de la Isoniacida es cada vez más recomendable mediante métodos rápidos de amplificación de ácidos nucleicos, los cuales deberían ir incorporando de forma sistemática la detección molecular a ambos fármacos. En cuanto a los niveles de resistencia asociados con la Rifampicina, es importante remarcar el hecho de que en este estudio REMOTUBES el 100% de las

mutaciones se encontraron en el gen *rpoB*, superando el 95% descrito en diversos estudios. Analizándolas con más detalle, la mayoría (76%) de estas se localizaron en el codón 531. Las mutaciones en los codones 516, 526 y 531 del gen *rpoB* confieren altos niveles de resistencia a la Rifampicina, particularmente en áreas con alta prevalencia de MDR-TB [Tajbakhsh 2018]. Para la Rifampicina, las resistencias de alto nivel implican resistencia a las demás rifamicinas, tal y como se demuestra en este estudio dónde 19/25 (76%) de los resistentes a la Rifampicina también resultaron serlo a la Rifabutina. Sin embargo, cuando se deben a mutaciones en el codón 514, 516 o 533, entre otros, pueden ser sensibles a la Rifabutina u otras rifamicinas, siendo así estos fármacos de utilidad en el tratamiento de la tuberculosis en pacientes coinfectados por el VIH. Por otro lado, alteraciones en los codones 511, 518 y 522 suelen conferir una resistencia de bajo nivel a la Rifampicina y a la Rifapentina, y una sensibilidad conservada a la Rifabutina y al Rifalazil. Aunque en España existe una baja prevalencia de tuberculosis multirresistente, es importante determinar, de forma actualizada, las mutaciones implicadas en la resistencia a la Rifampicina que permita adecuar los métodos moleculares disponibles para la detección rápida y precisa de dicha resistencia.

En el caso de la Estreptomicina, se ha detectado un porcentaje ligeramente superior de casos resistentes (6,23%) respecto al estudio RETUBES (4,4%) [Blanquer 2014]. No obstante, no es posible realizar una comparación con los datos aportados por el ECDC a nivel europeo ya que no siempre están disponibles los datos de sensibilidad a este fármaco, como sucede también con el Etambutol [ECDC 2019]. Con todo, es difícil explicar el motivo de la resistencia a la Estreptomicina, tanto en los casos sin tratamiento previo (5,5%), como sobre todo los tratados previamente (16,4%) ya que este fármaco es poco utilizado en los tratamientos estándar y especialmente en nuestro país, sin observarse, además, una gran diferencia entre los pacientes extranjeros y los nacidos en España. Otro aspecto interesante y algo sorprendente, fue que los métodos moleculares utilizados y recomendados por la OMS, fueron insuficientes en nuestro medio para la detección de la resistencia a la Estreptomicina, ya que solo se pudo detectar un aislamiento con una mutación (en el gen *rrs* C491T). En un estudio previo hace más de 10 años, dónde se trataba de

determinar la proporción y tipo de mutaciones en aislamientos de *M. tuberculosis* resistentes a Estreptomina en Barcelona y su relación con el nivel de resistencia, se observó que el 13% de los aislados presentaba alteraciones en el gen *rrs* [Tudó 2010]. Unos años más tarde en Asturias este porcentaje de resistencia a este aminoglucósido fue del 10% [Alba Álvarez 2017]. Por ello, se comprobó de nuevo en el estudio REMOTUBES las posibles mutaciones de las cepas resistentes a la Estreptomina en el gen *rrs*, corroborando la única mutación encontrada. Por otro lado, hay que tener en cuenta que los dos sistemas moleculares empleados en el estudio no contemplan mutaciones en el gen *rpsL*, que es un gen frecuentemente implicado en la resistencia a los aminoglucósidos (el 50-60% de las mutaciones). Probablemente, la incorporación de la detección de mutaciones en el gen *eis* para ser de utilidad a otros fármacos como la Kanamicina, ha conllevado ciertas limitaciones en la detección molecular de la resistencia a la Estreptomina.

En cuanto al Etambutol, de los 11 pacientes con resistencia fenotípica a este fármaco, tan solo en uno (9,1%) se detectó una mutación por los métodos moleculares utilizados, asociada al gen *embB* (M306I). Este dato se encuentra muy por debajo del mencionado en un trabajo en Portugal [Perdigão 2020], en el cual indicaban que el 62,6% de las cepas fenotípicamente resistentes al Etambutol presentaban mutaciones en M306V (52,7%) y en M306I y M306L (9,9%) del gen *embB*. Así pues, de modo similar que sucede con la Estreptomina, las pruebas moleculares no han resultado ser de gran ayuda, y aunque se ha demostrado su gran utilidad para la Rifampicina e Isoniacida, es probable que su uso para la Estreptomina y el Etambutol se vea limitado y sea necesario emplear métodos alternativos o complementarios a los utilizados y recomendados por la OMS. Un aspecto relevante fue la observación que, de los 11 casos resistentes al Etambutol, en nueve la persona enferma había nacido en el extranjero. Si bien se trata de un número de casos muy pequeño para poder valorar en profundidad.

En lo que respecta a la Pirazinamida, la mayoría de las mutaciones (72-97%) se localizan en el gen *pncA* y se asocian a altos niveles de resistencia fenotípica, siendo la principal causa de resistencia a la Pirazinamida en *M. tuberculosis*, y en menor medida

con las bombas de expulsión activa o los mecanismos relacionados con la permeabilidad, confiriendo bajos niveles de resistencia. Sin embargo, en este estudio no se detectaron resistencias mediante los métodos moleculares porque ninguna de las dos técnicas comerciales empleadas abarcaba mutaciones para este medicamento. Hoy por hoy, no existen técnicas moleculares rápidas estandarizadas y/o automatizadas o semiautomatizadas que permitan detectar mutaciones en el gen *pncA*, teniendo que recurrir a la secuenciación.

En cuanto a las fluoroquinolonas, la totalidad de las mutaciones relacionadas con su resistencia se detectan en el gen *gyrA* (50-90%) y en el gen *gyrB* (10%) [Cui 2011], de ahí la importancia de que los métodos moleculares disponibles en la actualidad permitan detectar alteraciones en ambos genes, especialmente el gen *gyrA*, asociado a su vez con resistencia fenotípica de alto nivel. Los datos obtenidos en el estudio parecen ir en esa línea: de entre los 105 casos a los que se les realizaron las pruebas de sensibilidad para los fármacos de segunda línea, seis de ellos presentaron resistencia a las fluoroquinolonas (Levofloxacin), teniendo en cuatro (66,7%) de ellos mutaciones en el gen *gyrA*. Si bien es cierto que las técnicas moleculares utilizadas incluyen sondas que cubren mutaciones en *gyrB*, no se detectó ninguna en el estudio. En general, tanto las fluoroquinolonas como los aminoglucósidos serían los principales objetivos de las pruebas moleculares en los fármacos de segunda línea.

En general, algunas mutaciones detectadas pueden revelar la presencia de resistencias cruzadas entre los fármacos útiles en el tratamiento de la tuberculosis. Un ejemplo de ello es la Isoniacida, en concreto aquellas mutaciones que afectan al gen *inhA*, las cuales suponen resistencia cruzada con la Etionamida, como se comentó. Este hecho se debe a que comparten parte del mecanismo de acción, inhibiendo la síntesis de ácidos micólicos. Sin embargo, esto no sucede con las mutaciones en el gen *katG* de la Isoniacida porque la resistencia se basa en la falta de activación del profármaco [Alcaide 2016]. En este estudio, el 56,3% de los casos resistentes a la Isoniacida y a la Etionamida presentaron mutaciones en el gen *inhA*, corroborando esta posible resistencia cruzada, lo que supone un porcentaje algo más bajo de lo que se esperaba inicialmente en función de experiencias previas de otros autores. Sin embargo, es bien conocida la heterogenicidad de los diversos estudios acerca de la resistencia cruzada

entre la Isoniacida y la Etionamida. Así en Corea, Lee *et al.* analizaron 24 aislamientos multirresistentes por secuenciación del gen *inhA*, de los cuales 12 (50%) fueron resistentes a la Etionamida. Se identificó la mutación del codón C-94T en el 100% de los aislamientos resistentes a ambos fármacos y en un 16,7% de los aislamientos resistentes solo a la Isoniacida [Lee 2000]. En Tailandia, Booniam *et al.* analizaron 160 aislamientos resistentes a la Isoniacida, de los cuales el 79,4% presentó mutación en el codón 315. De 24 aislamientos resistentes a la Etionamida, el 54,2% mostró mutaciones en el gen *ethA* y solo seis (25%) aislamientos presentaron mutaciones en *inhA*, pero fueron sensibles a la Etionamida [Booniam 2010]. Con ello, la inclusión de la Etionamida en el tratamiento de regímenes de segunda línea debería ser analizada fenotípicamente para conocer su sensibilidad y poder ser considerada una alternativa terapéutica. En el caso de la resistencia cruzada entre Rifampicina y Rifabutina, los datos presentados en el estudio REMOTUBES (76%) se encuentran cerca del alto nivel de resistencia cruzada obtenido en otros estudios (88%), destacando la importancia de evaluar la sensibilidad a la Rifabutina antes de su inclusión en los regímenes de tratamiento de la tuberculosis [Uzun 2002]. Otros casos en los que se ha demostrado que se puede dar resistencia cruzada es entre la Capreomicina y la Amikacina/Kanamicina [Maus 2005], tal y como muestran los resultados de este trabajo (el 33,4% de los casos resistentes a la Capreomicina también lo eran a la Amikacina), o entre la Estreptomina y la Kanamicina [Sugawara 2009], si bien es cierto que no siempre se cumple esta relación. De hecho, en este trabajo, de los 50 casos resistentes a la Estreptomina tan solo 2 lo fueron también a la Kanamicina. También se ha descrito la resistencia cruzada entre la Amikacina y la Estreptomina [Sugawara 2009], cumpliéndose esta en el presente estudio REMOTUBES, ya que el 100% de los pacientes con resistencia a la Amikacina también lo fueron a la Estreptomina.

Los factores de riesgo asociados a la tuberculosis multirresistente fueron: el tratamiento previo de tuberculosis, tener coinfección por el VIH y ser extranjero (Tabla 7). De entre esos tres factores, el más importante fue el hecho de haber sido tratado previamente con fármacos antituberculosos, como era de esperar, representando un riesgo diez veces mayor de tener MDR-TB respecto a los casos nuevos de tuberculosis

(Tabla 7). En general, en los casos de fracaso terapéutico o de recidiva tras el uso de un tratamiento con un régimen estándar es muy probable que aparezca una resistencia adquirida a la Isoniacida y a la Rifampicina (MDR-TB). El riesgo de incumplimiento es mayor después de la fase inicial del mismo, transcurridas las primeras 6-8 semanas. Los fallos en la cumplimentación del tratamiento conllevan fracasos terapéuticos y aparición de resistencias secundarias. El segundo factor a tener en cuenta es la coinfección por el VIH; los pacientes infectados por este virus tienen un riesgo cuatro veces mayor de presentar tuberculosis multirresistente (Tabla 7). En estos casos la clave vuelve a ser un adecuado tratamiento para ambos patógenos, incluyendo su correcto cumplimiento. En cuanto al factor demográfico más relevante para la resistencia (inicial y adquirida), este parece ser la procedencia del paciente (nacido en España o bien ser extranjero), suponiendo un riesgo seis veces mayor de presentar MDR-TB aquellas personas extranjeras respecto a las nacidas en España (Tabla 7). De manera habitual en tuberculosis, se ha señalado que la inmigración juega un papel muy importante en las resistencias relacionadas con esta enfermedad [Espinal 2001]. Observando la Tabla 8 ya se ve que el porcentaje de casos con alguna resistencia en el presente estudio fue mayor en extranjeros (17,9%) que en autóctonos (10,5%), pero esta diferencia se remarca y acrecienta aún más si hablamos de casos con resistencia a la Isoniacida y los casos MDR-TB, llegando a ser estos últimos del 4,9% y 0,8%, respectivamente. Esto podría ser explicado, en parte, mediante el fenómeno migratorio observado en España en los últimos años. Analizando más profundamente estos datos (Tabla 8), se observó que la diferencia fue más notoria en los pacientes MDR-TB tratados previamente, siendo casi 10 veces superior en extranjeros (29,2%) respecto a los nacidos en España (2,7%). Esto destaca el hecho de mantener un especial control en este grupo poblacional, así como un rápido diagnóstico de la enfermedad y su sensibilidad a los fármacos antituberculosos para iniciar cuanto antes un tratamiento adecuado y romper la cadena de transmisión.

En términos generales, el resultado del tratamiento farmacológico en el estudio REMOTUBES fue satisfactorio en su gran mayoría, alcanzando niveles cercanos al 90%, remarcando el buen uso de las pautas farmacológicas establecidas en España y recomendadas por la OMS para todos los países. El último informe del ECDC, con datos

del 2018, señala un porcentaje global de casos con resultados satisfactorios del 86,6% de los pacientes [ECDC 2020]. Así pues, España presenta unos resultados similares a la media europea, y muestra porcentajes superiores al objetivo del 85% establecido internacionalmente. En relación a los casos con multirresistencia, los datos del presente estudio evidencian dos hechos. Por un lado, es de gran importancia que todo el tratamiento asocie al menos cuatro fármacos no utilizados previamente o la prescripción de una terapia individualizada, evitando el uso de tan solo tres antimicrobianos. Por otro lado, la tasa de éxito en este grupo de pacientes (MDR-TB) fue baja (hasta un 40%), lejos del 57% que muestra la OMS con los datos de 2017 en su último informe publicado [WHO Tuberculosis Report 2020], si bien es cierto que hubieron casos en los que se prolongó el tratamiento y cuyo resultado final es desconocido en el momento del análisis actual. Este último hecho remarca, una vez más, la importancia de la vigilancia y seguimiento de las cepas multirresistentes, así como su correcta pauta de tratamiento.

Este estudio REMOTUBES presenta una serie de limitaciones, como el hecho de no poder cubrir toda la población española en su totalidad. Para tratar de minimizar este sesgo y que el estudio fuese lo más representativo posible, se incluyeron múltiples centros sanitarios de referencia pertenecientes a varias comunidades autónomas y que abarcasen áreas con gran población. Otra limitación fue la necesidad de disponer del consentimiento informado del paciente, que no siempre se pudo obtener. Además, el no conocer todas las mutaciones que confieren resistencia a los antimicrobianos de primera y segunda línea, así como la limitación de mutaciones comprendidas en las técnicas comerciales empleadas para el estudio molecular de resistencias, conlleva un cierto sesgo a tener en cuenta.

En conclusión, los resultados globales del estudio REMOTUBES muestran bajos niveles de resistencia a los fármacos empleados contra la tuberculosis en España, en consonancia con estudios anteriores. El antimicrobiano que presentó más resistencias asociadas fue la Isoniacida, con la mayoría de sus mutaciones en el gen *katG*. En el caso de la Isoniacida y los casos MDR-TB, estos últimos de gran relevancia clínica, se han observado niveles de resistencia inicial (sin tratamiento previo) similares a estudios anteriores. En cuanto al porcentaje de casos con tratamiento antituberculoso

previo, se observó una disminución de los niveles de resistencia en este grupo para la Isoniacida, y niveles estables en los casos MDR-TB, probablemente debido a un correcto seguimiento y tratamiento de los pacientes. Pese a estos buenos datos, y en vistas de la infranotificación de los casos de resistencia en tuberculosis, sería muy recomendable seguir estimulando la realización de estudios de vigilancia epidemiológica que sean lo más representativos posibles, geográfica y temporalmente, para conocer la situación real y evolutiva de la tuberculosis resistente en España.

CAPÍTULO 2

Estudio evolutivo de las resistencias a los fármacos antituberculosos en España (2006-2016)

Introducción

La tuberculosis, enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis* complex, constituye uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, siendo la enfermedad infecciosa con mayor mortalidad causada por un solo microorganismo. En 2019 se estimó que 10 millones de personas enfermaron de tuberculosis, de los cuales fallecieron 1,4 millones [WHO Tuberculosis Report 2020]. Si se tienen en cuenta los informes previos de la OMS, se observa una disminución a nivel mundial de la tasa de incidencia anual de tuberculosis, siendo esta de un 6,3% entre 2015-2018, del mismo modo que sucedió con la mortalidad asociada a la tuberculosis, la cual también disminuyó un 11% en ese mismo periodo [WHO TB Report 2019].

La tuberculosis resistente a los fármacos es uno de los mayores problemas a nivel mundial. El hecho de poseer una cepa resistente puede conllevar una mayor gravedad de la enfermedad, una menor tasa de curación, prolongación del tratamiento, así como un incremento de la toxicidad y coste económico. Durante el periodo 2003-2017, la OMS analizó los niveles de resistencia a la Isoniacida en 149 países, obteniendo un promedio global de resistencia del 7,1% en casos nuevos (sin tratamiento previo), y de un 7,9% en casos de tuberculosis tratados anteriormente. En cuanto a los datos más recientes sobre la tuberculosis multirresistente (MDR-TB), es decir, al menos mostraron resistencia conjunta a la Rifampicina e Isoniacida, la OMS notificó en 2019 un total de 206.030 casos MDR-TB declarados en el mundo, lo que supone un incremento del 10% más respecto a los datos del año 2018 [WHO Tuberculosis Report 2020]. Cerca de la mitad de los casos MDR-TB pertenecían a pacientes de la India, China y Federación Rusa. Aunque el mayor número de casos ocurren en las zonas menos industrializadas y más pobladas del planeta, los movimientos migratorios, la infección por el VIH, incremento de los pacientes inmunodeprimidos no VIH y la crisis económica global están ocasionando, en los últimos años, aumentos significativos de la incidencia en los países con mayor renta per cápita. El Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) junto con la Oficina Regional Europea de la OMS, elabora un informe anual que recoge los datos de vigilancia de la tuberculosis de los distintos países de la Unión Europea y del Área Económica Europea.

esta enfermedad: entre el periodo 2007-2016, la incidencia de casos de tuberculosis disminuyó en un 4,1%, así como la mortalidad en un 5,5% en Europa [ECDC 2018]. En cuanto a las resistencias, durante 2012-2016, el ECDC notificó un descenso del 5,5% de casos de MDR-TB en pacientes que no habían recibido tratamiento contra la tuberculosis previamente, y una disminución del 11,9% en pacientes que sí habían sido tratados con anterioridad.

En el plano nacional, la vigilancia de la tuberculosis en España se encuentra regulada legislativamente desde 1995, año en el que se crea la Red Nacional De Vigilancia Epidemiológica (RENAVE), de carácter descentralizado e integrada por profesionales y técnicos de Salud Pública de los departamentos de salud local, autonómica y estatal [BOE 1996]. Este sistema de vigilancia se basa en la notificación de enfermedades de declaración obligatoria, teniendo como finalidad la detección precoz de problemas de salud para facilitar la toma de medidas encaminadas a proteger la salud de la población. Con el paso de los años se han ido incluyendo todas las formas de tuberculosis [Boletín Epidemiológico Semanal (I y II) 2003], además de mejoras en la encuesta de declaración individualizada para pruebas de laboratorio, test de sensibilidad y factores de riesgo [Grupo de trabajo de los Protocolos 2014]. A lo largo de 2016 se notificaron en España un total de 4.877 casos de pacientes con esta enfermedad, siendo el 97% casos nuevos o recaídas, mientras que el 3% restante correspondían a pacientes que habían recibido previamente tratamiento antituberculoso. Del total de casos notificados, casi un tercio de ellos eran extranjeros (28,5%). En cuanto a la resistencia a los fármacos, el 4,4% de casos eran MDR-TB [ECDC 2018]. A pesar de la creación de RENAVE, en España existe una monitorización insuficiente para la tuberculosis, no incluyendo en la declaración obligatoria la notificación de datos relevantes del paciente y del laboratorio. Esta infra-notificación conlleva una cierta limitación en las cifras aportadas sobre la tuberculosis en nuestro país [WHO Tuberculosis Report 2020].

Para tratar de determinar la verdadera situación de la infección por MTUBC en España, se han realizado a lo largo de los años diversos estudios más o menos representativos a nivel geográfico y/o temporal [Caylà 2009], así como otros estudios realizados por el Programa Integrado de Investigación en Tuberculosis (PII-TB) de la

SEPAR, el GEM en 2008 [Jiménez 2008] y la UITB [Martín-Casabona 2000]. Estos tratan de aportar más información en temas como la vigilancia y los protocolos a seguir [Grupo de trabajo de los protocolos 2014], factores asociados con el tabaquismo, mortalidad [Rodrigo 2016], infra-notificación [Morales-García 2015] y el cumplimiento del tratamiento [Caylà 2004] en pacientes enfermos de tuberculosis. Algunos trabajos, incluso, analizaron la evolución y situación de la resistencia a la tuberculosis en España [Blanquer 2014; Caminero 2003; Jiménez-Fuentes 2016; Martín-Casabona 2000; Gutiérrez-Aroca 2018]. Sin embargo, se observa una gran variabilidad geográfica y entre los estudios, impidiendo dar una imagen representativa reciente de esta enfermedad en España.

El objetivo de este trabajo fue conocer la resistencia a los fármacos antituberculosos de primera y segunda línea (en caso de haber resistencia a los de primera línea), en aislamientos clínicos de MTUBC procedentes de múltiples centros hospitalarios de España, así como analizar su tendencia en nuestro país durante el periodo 2006-2016.

Materiales y métodos

Diseño del estudio

Estudio retrospectivo descriptivo de 11 años de duración (desde el 1 de enero de 2006 hasta el 31 de diciembre de 2016), en el que se incluyeron pacientes diagnosticados de tuberculosis procedentes de 67 hospitales o centros socio-sanitarios de España. La información demográfica y clínica se ha obtenido a partir de la base de datos de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR), creada en 2006, y disponible para todos los investigadores y facultativos miembros de dicha sociedad.

Los criterios de inclusión de los pacientes fueron los siguientes: 1) Disponer del consentimiento informado del paciente o de los padres/tutores en caso de ser menor de edad; 2) Cultivo positivo de *M. tuberculosis* complex, o bien presencia de granulomas caseificantes en la histología; 3) Pacientes con sospecha clínica, radiológica, epidemiológica y/o de laboratorio en los que su médico considere adecuado el tratamiento antituberculoso.

Análisis de los datos

Las variables socio-demográficas analizadas fueron: edad, sexo, país de nacimiento, convivencia y hábitos tóxicos (tabaco, alcohol y/o drogas). También se tuvieron en cuenta los antecedentes personales (tuberculosis previa, coinfección con VIH u otras inmunodepresiones), y datos clínicos como la localización principal de la enfermedad tuberculosa (pulmonar o extrapulmonar). Asimismo, se analizaron los resultados del estudio de sensibilidad a los cuatro principales fármacos antituberculosos de primera línea (SIRE): Isoniacida, Rifampicina, Etambutol y Estreptomomicina. Adicionalmente, también se estudiaron los datos relativos a la Pirazinamida en aquellos casos dónde se realizaron las pruebas de sensibilidad para este fármaco. Además del estudio de estos fármacos de primera línea, se analizaron los de segunda línea en caso de resistencia a los primeros, siempre que se dispusieran de tales resultados. De igual modo, también constan los datos relativos a la evolución del paciente, pudiendo tener un resultado del tratamiento satisfactorio (curación) o no satisfactorio (abandono, fracaso terapéutico, traslado, pérdida del paciente o fallecimiento).

La variable “edad” se dividió en 4 grupos: los pacientes menores de edad (17 años o menos), los jóvenes con edades comprendidas entre los 18 y 30 años, los adultos (de 31 a 50 años), y los pacientes mayores si sobrepasaban los 50 años. En cuanto a la resistencia, se consideraron pan-sensibles aquellos casos que resultaron ser sensibles a los principales cuatro fármacos antituberculosos de primera línea, monorresistentes si presentaron resistencia a un solo fármaco de SIRE, y multirresistentes (MDR-TB) si hubo resistencia conjunta a la Rifampicina e Isoniacida. Cualquier otra combinación de resistencia a varios fármacos no contemplada como MDR-TB se agrupó en otras resistencias.

Estudio microbiológico

Las muestras no estériles de los pacientes incluidos en el estudio fueron pre-tratadas siguiendo el método de digestión-descontaminación desarrollado por Kubica *et al.* [Kubica 1963], mientras que las muestras estériles se procesaron directamente. A todas se les realizó un examen microscópico (tinción Auramina y/o Ziehl-Neelsen) y

cultivo en medio líquido y sólido. Parte del volumen restante se congeló para estudios posteriores.

Los estudios de sensibilidad a los fármacos de primera y segunda línea se realizaron mediante los métodos estándar recomendados por diversas organizaciones y sociedades científicas, como la OMS, CLSI, SEIMC o los CDC. Estos estudios se basaron en el método modificado de las proporciones múltiples en medio líquido mediante los sistemas automatizados BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, EEUU) y VersaTrek (TREK Diagnostics, EEUU). Para el MGIT 960, las concentraciones críticas o puntos de corte de los fármacos de primera línea fueron: 0,1 µg/ml de Isoniacida, 1 µg/ml de Rifampicina, 5 µg/ml de Etambutol, y 100 µg/ml de Pirazinamida. En el caso de la Estreptomina, esta fue de 1 µg/ml. En cuanto a los fármacos de segunda línea, las concentraciones críticas para este sistema fueron las siguientes: 1 µg/ml de Amikacina, 2,5 µg/ml de Capreomicina, 1 µg/ml de Levofloxacino, 2 µg/ml de Ofloxacino, 0,25 µg/ml de Moxifloxacino, 1 µg/ml de Linezolid, 5 µg/ml de Etionamida, y 2,5 µg/ml de Kanamicina [WHO CC DST 2018]. Para el VersaTrek, las concentraciones críticas utilizadas en los fármacos de primera línea, fueron: 0,1 µg/ml para la Isoniacida, 1 µg/ml para la Rifampicina, 5 µg/ml para el Etambutol, 2 µg/ml para Estreptomina, y 300 µg/ml para la Pirazinamida [VersaTrek Myco, Streptomycin, PZA 2010].

Análisis estadístico

El estudio estadístico comprendió el análisis univariado sobre los posibles factores de riesgo asociados con la presencia de la enfermedad clínica, determinando el *odds ratio* (OR) y los intervalos de confianza del 95% (IC). Las diferencias estadísticamente significativas se definieron como $p < 0.05$ utilizando la prueba de ji cuadrado (distribución de Pearson) y el test exacto de Fisher.

Aspectos éticos

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con los requerimientos expresados en la Declaración de Helsinki (revisión de Tokio, octubre de 2004), la ley Orgánica Española de Protección de Datos 15/1999 y la ley 14/1986 General de Sanidad. Cada centro participante debía disponer de un informe favorable del comité ético y de

investigación clínica (CEIC). Al tratarse de un estudio de carácter retrospectivo no ha sido necesario un nuevo informe del CEIC, debido a que los datos procedieron de estudios anteriores que ya tenían la aprobación de dicho comité ético de cada centro participante.

Los pacientes incluidos en este trabajo ya habían autorizado el uso de sus datos personales en anteriores trabajos relacionados con la base de datos de la SEPAR. De este modo, su autorización previa fue válida para este estudio retrospectivo. Los pacientes fueron anonimizados en la base de datos, siendo solo conocidos por el médico responsable de cada paciente. El investigador tuvo acceso a los datos y, en caso de ser necesario, también pudo disponer de tal información el CEIC correspondiente y las autoridades sanitarias.

Resultados

Se incluyeron en el aplicativo informático del PIITB de la SEPAR un total de 4.903 casos de tuberculosis a lo largo del periodo de estudio (2006-2016), de los cuales 4.755 (96,9%) presentaron diagnóstico confirmado para esta enfermedad. De ellos, 4.425 (93%) tuvieron cultivo positivo, y 4.268 (93%) dispusieron además de los datos de sensibilidad a los fármacos antituberculosos (Figura 11), al menos a la Isoniacida y Rifampicina. Un total de 4.006 (93,7%) casos contaron con los datos referentes a las pruebas de sensibilidad para los cuatro principales fármacos de primera línea (SIRE: Estreptomina, Isoniacida, Rifampicina y Etambutol). Estos 4.006 casos, procedentes de 67 hospitales o centros socio-sanitarios de España (Tabla 9), se consideraron la población final de estudio.

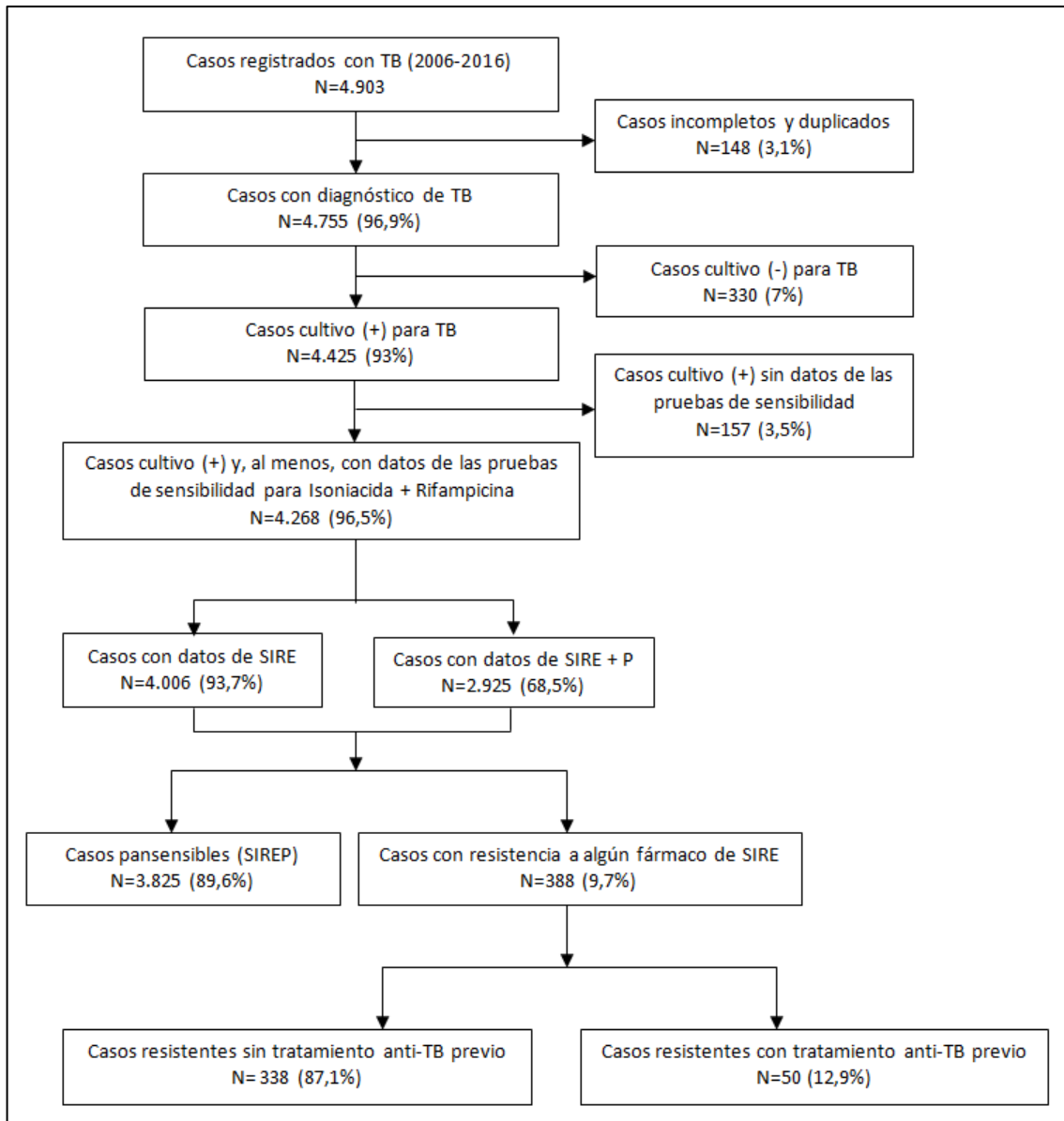


Figura 11. Diagrama de flujo que describe el proceso de selección de los casos. TB=tuberculosis; SIRE=Estreptomina, Isoniacida, Rifampicina, Etambutol; P=Pirazinamida.

CAPÍTULO 2: Evolución de las resistencias en España (2006-2016)

Tabla 9. Listado de los centros hospitalarios participantes en el estudio en base a la comunidad autónoma dónde se encuentran. España 2006-2016.

Andalucía	Aragón	Asturias	Canarias
Hospital Costa del Sol	Hospital General San Jorge	Hospital Universitario de Cabuñes	Hospital Universitario de Gran Canaria Dr Negrín
Hospital Universitario Puerto Real	Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa	Hospital San Agustín	Hospital General de Fuerteventura Virgen de la Peña
Hospital Universitario Reina Sofía	Castilla y León	Hospital Universitario Central de Asturias	Hospital Universitario Insular de Gran Canaria
Hospital regional de Málaga (Hospital Carlos Haya)	Hospital El Bierzo	Cantabria	Cataluña
Complejo Hospitalario de Jaén	Hospital Río Carrión	Hospital Universitario Marqués de Valdecilla	Centro Asistencial Dr. Emili Mira I López
Hospital Universitario de Jerez de la Frontera	Hospital de León	Hospital Sierrallana	Consorci Sanitari de Terrassa
Hospital Santa Ana de Motril	Comunidad Valenciana	Galicia	Consorci Corporació Sanitària Parc Taulí de Sabadell
Hospital Universitario San Cecilio	Hospital Clínic Universitari de València	Complejo Hospitalario de Pontevedra	Hospital Universitario Arnau de Vilanova
Hospital Universitario Virgen de las Nieves	Hospital Marina Baixa	Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña	Hospital del Mar
Hospital Universitario Virgen Macarena	Hospital General Universitari de Castelló	Hospital de Calde	Hospital Universitari Mútua Terrassa
Hospital Universitario Virgen del Rocío	Hospital General Universitari de València	Hospital HM Modelo	Hospital Universitari Germans Trias i Pujol
Hospital de poniente - El Ejido	Hospital Universitari i Politècnic La Fe	Comunidad de Madrid	Hospital Universitari Joan XXIII
Castilla-La Mancha	Hospital Universitario Dr. Peset	Complejo Hospitalario La Paz-Cantoblanco-Carlos III	Hospital Universitario Sant Joan de Reus
Complejo Hospitalario Universitario de Albacete	Islas Baleares	Hospital Universitario 12 de Octubre	Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
Hospital Universitario de Guadalajara	Hospital Son Llàtzer	Hospital Universitario de La Princesa	Hospital General del Parc Sanitari Sant Joan de Déu
Ceuta	La Rioja	País Vasco	Hospital de Sant Joan Despí Moisès Broggi
Hospital de la Cruz Roja de Ceuta	Complejo Hospitalario San Millán-San Pedro	Hospital de Cruces	Hospital Universitari de Bellvitge
Hospital Universitario de Ceuta	Navarra	Hospital Universitario de Galdakao	Hospital Universitari Vall d'Hebron
Murcia	Hospital de Navarra	Hospital Universitario de Donostia	Serveis Clínics
Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca		Hospital de Txagorritxu	
Hospital General Universitario Los Arcos del Mar Menor		Hospital de Santa Marina	

Resistencia y características socio-demográficas

La media de edad global de los participantes del estudio fue de 44 años. En el caso de los pacientes nacidos en España (67,9%), la edad media fue de 48 años, mientras que en los pacientes originarios de otro país fue de 34 años. De los 1.287 pacientes extranjeros, cerca de la mitad (49,2%) procedían de Rumania (13,4%), Bolivia (12,5%), Pakistán (12,0%), y Marruecos (11,3%).

De la población estudiada (4.006 casos), 3.403 (84,9%) personas presentaron tuberculosis pulmonar (Tabla 10). En referencia a este grupo, 138 (40,8%) presentaron monorresistencias para la Isoniacida, y 80 (23,7%) monorresistencias para la Estreptomina. Las características socio-demográficas y clínicas se compararon con los tipos de resistencia, tal y como se muestra en la Tabla 10 y Tabla 11, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas ($p=0,20$) en el análisis de cualquier tipo de resistencia con los casos que mostraron tuberculosis pulmonar (338/3.403; 9,9%) y extrapulmonar (50/603; 8,3%).

Los datos relativos a la asociación de las principales características socio-demográficas analizadas con la presencia de tuberculosis multirresistente para determinar posibles factores de riesgo quedan reflejados en la Tabla 12. En ella se aprecia que sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre en la edad (concretamente en mayores de 50 años), el país de origen del paciente (España vs otro), en determinados tipos de convivencia (en grupo, sin domicilio propio y en prisión), padecer el VIH y si habían recibido tratamiento previo para esta enfermedad o no.

Tabla 10. Características socio-demográficas de los pacientes (N=4.006) con cultivo positivo y datos de las pruebas de sensibilidad para la Isoniacida, la Rifampicina, el Etambutol (SIRE), y los casos multirresistentes (MDR-TB).

Características	Número total de casos		Pan-sensibles (SIRE)		Estreptomina		Isoniacida		Rifampicina		Etambutol		MDR-TB	
	N (%)	N (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	N (%)
Total	4.006 (100)	3.618 (90,3)	3.823 (95,4)	183 (4,6)	3.728 (93,0)	278 (7,0)	3.949 (98,5)	67 (1,5)	3.965 (99,0)	41 (1,0)	63 (1,6)			
Sexo														
Hombres	2.626 (65,6)	2.362 (65,3)	2.502 (65,4)	124 (67,8)	2.437 (65,4)	189 (68,0)	2.584 (65,4)	42 (62,7)	2.600 (65,6)	26 (63,4)	39 (61,9)			
Mujeres	1.380 (34,4)	1.256 (34,7)	1.321 (34,6)	59 (32,2)	1.291 (34,6)	89 (32,0)	1.355 (34,6)	25 (37,3)	1.365 (34,4)	15 (36,6)	24 (38,1)			
Edad														
Menores (0-17)	73 (1,7)	62 (1,7)	67 (1,8)	6 (3,3)	63 (1,7)	10 (3,6)	71 (1,8)	2 (3,0)	73 (1,8)	0	2 (3,2)			
Adultos (18-64)	3.269 (81,6)	2.929 (81,0)	3.101 (81,1)	158 (86,3)	3.023 (81,1)	236 (84,9)	3.208 (81,2)	61 (91,0)	3.223 (81,3)	36 (87,8)	57 (90,5)			
Mayores (65+)	674 (16,7)	627 (17,3)	655 (17,1)	19 (10,4)	642 (17,2)	32 (11,5)	670 (17,0)	4 (6,0)	669 (16,9)	5 (12,2)	4 (6,3)			
País de procedencia														
España	2.719 (67,9)	2.510 (69,4)	2.626 (68,7)	93 (50,8)	2.572 (69,0)	147 (52,9)	2.690 (68,1)	29 (43,3)	2.701 (68,1)	18 (43,9)	27 (48,9)			
Otro	1.287 (32,1)	1.108 (30,6)	1.197 (31,3)	90 (49,2)	1.156 (31,0)	131 (47,1)	1.259 (31,9)	38 (56,7)	1.264 (31,9)	23 (56,1)	36 (51,1)			
Convivencia														
Familia	2.960 (73,9)	2.699 (74,6)	2.838 (74,2)	122 (66,7)	2.771 (74,3)	189 (68,0)	2.925 (74,0)	35 (52,2)	2.933 (74,0)	27 (65,6)	33 (52,4)			
Solo/a	503 (12,6)	447 (12,4)	478 (12,5)	25 (13,7)	468 (12,6)	35 (12,6)	496 (12,6)	7 (10,5)	498 (12,6)	5 (12,2)	5 (7,9)			
Grupo	414 (10,3)	360 (10,0)	385 (10,0)	29 (15,8)	375 (10,1)	39 (14,0)	396 (10,0)	18 (26,9)	407 (10,3)	7 (17,4)	18 (28,6)			
Sin domicilio	82 (2,0)	71 (2,0)	79 (2,1)	3 (1,6)	72 (1,9)	10 (3,6)	78 (2,0)	4 (6,0)	81 (2,0)	1 (2,4)	4 (6,3)			
Confinamiento	47 (1,2)	41 (1,0)	43 (1,2)	4 (2,2)	42 (1,1)	5 (1,8)	44 (1,4)	3 (4,4)	46 (1,1)	1 (2,4)	3 (4,8)			
Tabaco														
No fumador/a	1.851 (46,2)	482 (13,3)	1.752 (45,8)	99 (54,1)	1.712 (45,9)	139 (50,0)	1.815 (46,0)	36 (53,7)	1.832 (46,2)	19 (46,3)	34 (54,0)			
Fumador/a	1.623 (40,5)	1.480 (41,0)	1.559 (40,8)	64 (35,0)	1.524 (40,9)	99 (36,1)	1.599 (40,5)	24 (35,8)	1.604 (40,5)	19 (46,3)	22 (34,9)			
Ex-fumador/a (6+ meses)	532 (13,3)	1.656 (45,7)	512 (13,4)	20 (10,9)	492 (13,2)	40 (13,9)	525 (13,5)	7 (10,5)	529 (13,3)	3 (7,4)	7 (11,1)			
Alcohol														
No	2.883 (72,0)	2.582 (71,4)	2.740 (71,7)	143 (78,1)	2.669 (71,6)	214 (77,0)	2.833 (73,0)	50 (74,6)	2.852 (72,0)	31 (75,6)	46 (73,0)			
Sí	1.061 (26,5)	981 (27,1)	1.023 (26,8)	38 (20,8)	1.002 (26,9)	59 (21,2)	1.045 (26,5)	16 (23,9)	1.052 (26,5)	9 (22,0)	16 (25,4)			
NC	62 (1,5)	55 (1,5)	60 (1,5)	2 (1,1)	57 (1,5)	5 (1,8)	61 (0,5)	1 (1,5)	61 (1,5)	1 (2,4)	1 (1,6)			
Drogas														
No	3.740 (93,4)	3.379 (93,4)	3.567 (90,3)	173 (94,5)	3.480 (93,3)	260 (93,5)	3.679 (93,2)	61 (91,0)	3.701 (93,3)	39 (95,1)	59 (93,7)			
Sí	266 (6,6)	239 (6,6)	256 (9,7)	10 (5,5)	248 (6,7)	18 (6,5)	260 (6,8)	6 (9,0)	264 (6,7)	2 (4,9)	4 (6,3)			

SIRE=Estreptomina, Isoniacida, Rifampicina, Etambutol; S= Sensible; R=Resistente; MDR-TB=resistencia, al menos, a la Isoniacida y a la Rifampicina; TB=tuberculosis.

Tabla 11. Características clínicas de los pacientes (N=4.006) con cultivo positivo y datos de las pruebas de sensibilidad para la Estreptomina, la Isoniácida, la Rifampicina, la Etambutol, el Etambutol (SIRE), y los casos multirresistentes (MDR-TB).

Características	Número total de casos		Pan-sensibles (SIRE)		Estreptomina		Isoniácida		Rifampicina		Etambutol		MDR-TB	
	N (%)	N (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	N (%)
Total	4.006 (100)	3.618 (90,3)	3.823 (95,4)	183 (4,6)	3.728 (93,0)	278 (7,0)	3.949 (98,5)	67 (1,5)	3.965 (99,0)	41 (1,0)	63 (1,6)			
Infección por VIH														
No	3.223 (80,5)	2.910 (80,4)	3.066 (80,2)	157 (85,8)	3.001 (80,5)	222 (79,9)	3.167 (80,2)	56 (83,6)	3.185 (80,3)	38 (92,7)	53 (84,2)			
No sabe	591 (14,8)	535 (14,8)	571 (14,9)	20 (10,9)	552 (14,8)	39 (14,0)	586 (14,8)	5 (7,6)	589 (14,9)	2 (4,9)	4 (6,3)			
Sí	192 (4,7)	173 (4,8)	186 (4,9)	6 (3,3)	175 (4,7)	17 (6,1)	186 (5,0)	6 (9,0)	191 (4,8)	1 (2,4)	6 (9,5)			
inmunosupresiones														
No	3.642 (90,9)	3.287 (90,9)	3.474 (90,9)	168 (91,8)	3.390 (90,9)	252 (90,6)	3.581 (90,7)	61 (91,0)	3.604 (90,9)	38 (92,7)	57 (90,5)			
Sí	364 (9,1)	331 (9,1)	349 (9,1)	15 (8,2)	338 (9,1)	26 (9,4)	358 (9,1)	6 (9,0)	361 (9,1)	3 (7,3)	6 (9,5)			
Tratamiento previo TB														
No	3.693 (92,2)	3.355 (92,7)	3.535 (92,5)	158 (86,3)	3.454 (92,7)	239 (86,0)	3.645 (92,3)	48 (71,6)	3.658 (92,3)	35 (85,4)	44 (69,8)			
Sí	313 (7,8)	263 (7,3)	288 (7,5)	25 (13,7)	274 (7,3)	39 (14,0)	294 (7,7)	19 (28,4)	307 (7,7)	6 (14,6)	19 (30,2)			
Localización principal TB														
Pulmonar	3.403 (84,9)	3.065 (84,7)	3.243 (84,8)	160 (87,4)	3.158 (84,7)	245 (88,1)	3.345 (84,7)	58 (86,6)	3.367 (84,9)	36 (87,8)	55 (87,3)			
Extrapulmonar	603 (15,1)	553 (15,3)	580 (15,2)	23 (12,6)	570 (15,3)	33 (11,9)	604 (15,3)	9 (13,4)	598 (15,1)	5 (12,2)	8 (12,7)			
Síntomas cónicos														
Hemoptisis (Sí)	78 (1,9)	67 (1,9)	74 (1,9)	4 (2,2)	68 (1,8)	10 (3,6)	71 (1,8)	7 (10,4)	76 (1,9)	2 (4,9)	7 (11,1)			
Fiebre (Sí)	238 (5,9)	199 (5,5)	213 (5,6)	25 (13,7)	215 (5,8)	23 (8,3)	228 (5,8)	10 (14,9)	232 (5,9)	6 (14,6)	10 (15,9)			
Pérdida de peso (Sí)	263 (6,7)	227 (6,3)	242 (6,3)	21 (11,5)	240 (6,4)	23 (8,3)	255 (6,5)	8 (11,9)	258 (6,5)	5 (12,2)	8 (12,7)			
Tos (Sí)	373 (9,3)	319 (8,8)	340 (8,9)	33 (18,0)	339 (9,1)	34 (12,2)	358 (9,0)	15 (22,4)	366 (9,2)	7 (17,0)	15 (23,8)			
Expectoración (Sí)	225 (5,6)	187 (5,2)	205 (5,4)	20 (10,9)	199 (5,3)	26 (9,4)	214 (5,4)	11 (16,4)	220 (5,5)	5 (12,2)	11 (17,5)			
Radiografía del tórax														
Afectación no cavitaria	2.033 (50,7)	1.839 (50,2)	1.943 (50,8)	90 (49,2)	1.895 (50,8)	138 (49,6)	2.005 (50,8)	28 (41,8)	2.014 (50,8)	19 (46,3)	27 (42,9)			
Afectación cavitaria	1.511 (37,7)	1.355 (37,5)	1.434 (37,5)	77 (42,1)	1.399 (37,5)	112 (40,3)	1.479 (37,5)	32 (47,8)	1.493 (37,7)	18 (43,9)	30 (47,6)			
Normal	326 (8,6)	321 (8,9)	333 (8,7)	13 (7,1)	328 (8,8)	18 (6,5)	340 (8,6)	6 (9,0)	344 (8,7)	2 (4,9)	5 (7,9)			
No realizada	116 (2,9)	103 (2,8)	113 (3,0)	3 (1,6)	106 (2,8)	10 (3,6)	115 (2,1)	1 (1,5)	114 (2,9)	2 (4,9)	1 (1,6)			

SIRE=Estreptomina, Isoniácida, Rifampicina, Etambutol; S= Sensible; R= Resistente; MDR-TB=resistencia, al menos, a la Isoniácida y a la Rifampicina; TB=tuberculosis.

Tabla 12. Factores de riesgo asociados a la tuberculosis multirresistente (N=63).

Variable	MDR, n (%) (N=63)	No MDR, n (%) (N=3.943)	OR (95% IC)	Valor p
Sexo				
Hombre	39 (60,9)	2.587 (65,6)	Referencia	
Mujer	24 (39,1)	1.356 (34,4)	1,17 (0,70-1,96)	0,539
Edad (años)				
0-17	2 (3,2)	71 (1,8)	Referencia	
18-30	27 (42,9)	1.004 (25,5)	0,95 (0,22-4,09)	0,950
31-50	28 (44,4)	1.622 (41,1)	0,61 (0,14-2,62)	0,509
>50	6 (9,5)	1.246 (31,6)	0,17 (0,03-0,86)	0,032
Procedencia				
Nativo	27 (42,9)	2.692 (68,3)	Referencia	
Extranjero	36 (58,1)	1.251 (31,7)	2,87 (1,73-4,74)	<0,05
Convivencia				
Familia	33 (52,4)	2.927 (74,2)	Referencia	
Vive solo	5 (7,9)	498 (12,6)	0,89 (0,34-2,29)	0,810
Grupo	18 (28,6)	396 (10)	4,03 (2,24-7,22)	<0,05
Indigente	4 (6,3)	78 (2)	4,54 (1,57-13,15)	<0,05
Prisión	3 (4,8)	44 (1,2)	6,04 (1,78-20,46)	<0,05
Consumo tabaco				
No fumador	34 (54)	1.817 (46,0)	Referencia	
Fumador	22 (39,9)	1.601 (40,6)	0,73 (0,42-1,26)	0,262
Ex-Fumador	7 (11,1)	525 (13,4)	0,71 (0,31-1,61)	0,417
Alcohol				
No	46 (73)	2.898 (73,5)	Referencia	
Sí	17(27)	1.045 (26,5)	1,02 (0,58-1,79)	0,931
Drogas				
No	59 (93,7)	3.681 (93,4)	Referencia	
Sí	4 (6,3)	262 (6,6)	0,95 (0,34-2,64)	0,925
VIH				
No	57 (90,5)	3.757 (95,3)	Referencia	
Sí	6 (9,5)	186 (4,7)	2,12 (0,90-4,99)	0,083
Otras inmunosupresiones				
No	57 (90,5)	3.585 (90,9)	Referencia	
Sí	6 (9,5)	358 (9,1)	1,05 (0,45-2,46)	0,903
Tratamiento previo				
No	44 (69,8)	3.649 (92,5)	Referencia	
Sí	19 (30,2)	294 (7,5)	5,35 (3,08-9,29)	<0,05
Localización principal				
Pulmonar	55 (87,3)	3.348 (84,9)	Referencia	
Extrapulmonar	8 (12,7)	595 (15,1)	0,81 (0,38-1,72)	0,599

MDR: casos multirresistentes; OR: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

Distribución geográfica y temporal de los casos

La distribución temporal de los casos registrados a lo largo de los 11 años de estudio queda reflejada en la Figura 12, mientras que su distribución geográfica se puede observar en la Figura 13. En esta última, se aprecia cómo los centros sanitarios de Cataluña fueron los que registraron un mayor número de casos de pacientes enfermos de tuberculosis, representando una cuarta parte de los casos totales. A continuación, les siguen los centros hospitalarios de Asturias (13,6%), Canarias (11,7%) y de la Comunidad Valenciana (11,2%), agrupando más del 60% de los casos incluidos.

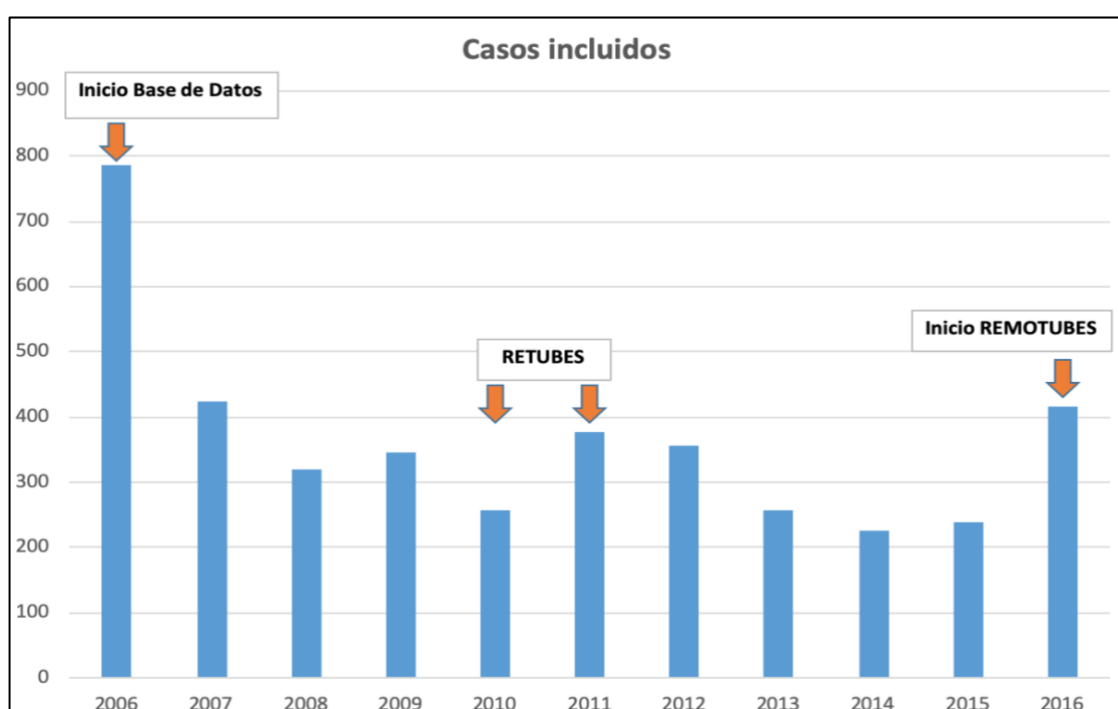


Figura 12. Distribución temporal de los casos estudiados durante 2006-2016, así como del inicio de la base de datos para registrar casos y del inicio de estudios que han empleado dicha base de datos.

La distribución geográfica por CCAA en los 388 casos con resistencia a algún fármaco SIRE fue la siguiente: 116 (29,9%) en Cataluña, 63 (16,2%) en las Canarias, 52 (13,4%) en Valencia, 38 (9,8%) en Andalucía, 31 (8,0%) en la Comunidad de Madrid, 24 (6,2%) casos en Galicia, 23 (5,9%) en Asturias, 13 (3,4%) en Baleares, 10 (2,6%) en el País Vasco, siete (1,8%) en La Rioja, seis (1,5%) en Cantabria, tres (0,8%) en Castilla-La Mancha y dos (0,5%) en Aragón.

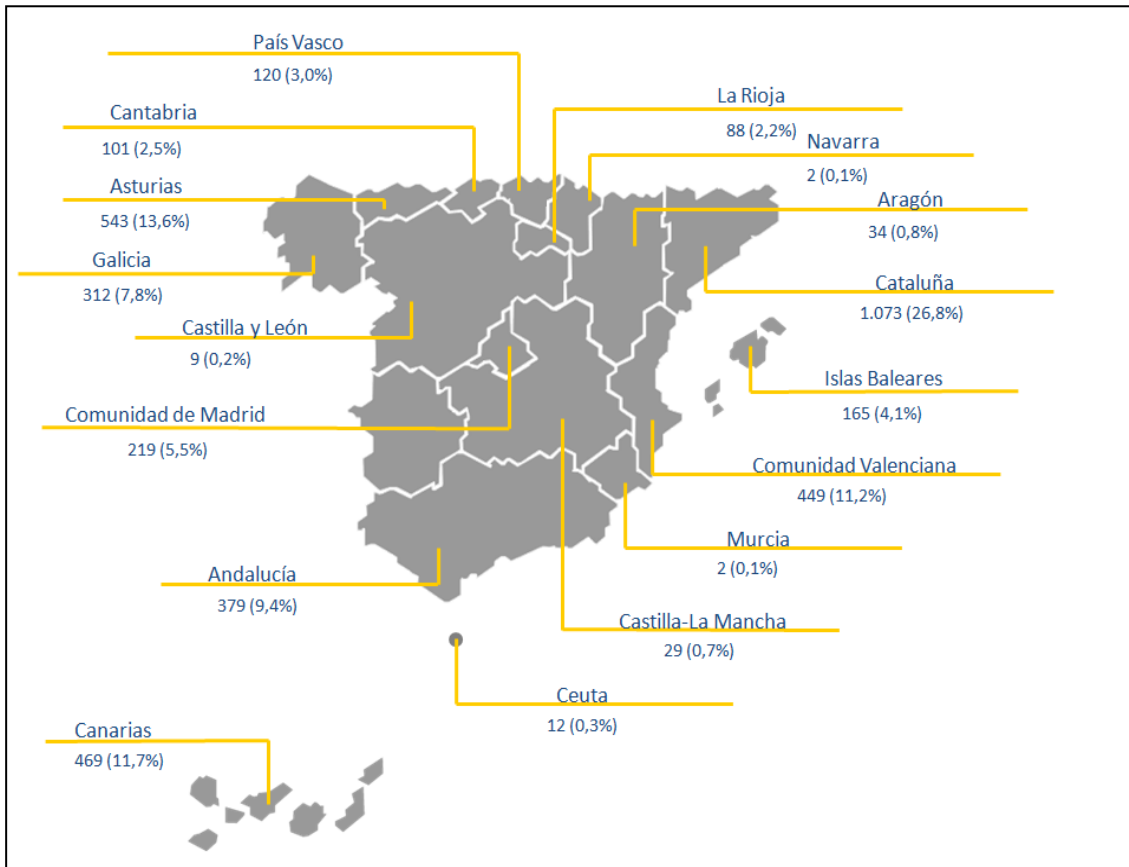


Figura 13. Distribución de los 4.006 casos con tuberculosis registrados en el estudio, y su proporción (%), por comunidades y ciudades autónomas en España (2006-2016).

Resistencia primaria y secundaria

En referencia a si los pacientes habían sido tratados mediante fármacos antituberculosos con anterioridad o no, un total de 3.693 (92,2%) pacientes no recibieron tratamiento contra la tuberculosis con anterioridad, mientras que 313 (7,9%) sí que habían sido tratados (Tabla 13). La proporción de casos con alguna resistencia era superior en los pacientes previamente tratados (50/313; 16,0%), en comparación con los nuevos casos (338/3.693; 9,2%). Esta diferencia es mayor en MDR-TB, siendo más de cuatro veces superior el porcentaje de pacientes MDR que ya habían recibido tratamiento anteriormente (19/313; 6,1%) en comparación al de los nuevos casos con MDR-TB (44/3.693; 1,2%).

Respecto al país de origen del paciente (España vs otro) y el hecho de haber recibido previamente o no tratamiento para la tuberculosis, se han observado

diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el total de casos con resistencia a algún fármaco antituberculoso, resistencia a la Isoniacida, y multirresistencia (MDR-TB).

Al analizar los pacientes sin tratamiento previo (resistencia primaria) y aquellos con tratamiento previo (resistencia adquirida), se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los casos con resistencia primaria cuando estos se compararon con el país de origen del paciente (Tabla 13).

Tabla 13. Casos con resistencia a la Isoniacida y casos MDR-TB en base a si han recibido (o no) tratamiento previo, y según el país de origen de los pacientes (N=4.006).

Pacientes	Total N (%)	Nativos N (%)	Extranjeros N (%)	Valor p
<i>Pacientes STP</i>	3.693	2.496 (67,6)	1.197 (32,4)	
Sensibles	3.355 (90,8)	2.320 (92,9)	1.035 (86,4)	Referencia
Resistentes	338 (9,2)	176 (7,1)	162 (13,6)	<0,05
Resistencia a la H	239 (6,5)	124 (5,0)	115 (9,6)	<0,05
MDR	44 (1,2)	18 (0,7)	26 (2,1)	<0,05
<i>Pacientes CTP</i>	313	223	90	
Sensibles	263 (84,0)	190 (85,2)	73 (81,1)	Referencia
Resistentes	50 (16,0)	33 (14,8)	17 (18,9)	0,396
Resistencia a la H	39 (12,5)	23 (10,8)	16 (17,7)	0,088
MDR	19 (6,1)	9 (4,0)	10 (11,1)	<0,05
<i>Total Pacientes</i>	4.006	2.719	1.287	
Sensibles	3.618 (90,3)	2.510 (92,3)	1.108 (86,1)	Referencia
Resistentes	388 (9,7)	209 (7,7)	179 (13,9)	<0,05
Resistencia a la H	278 (6,9)	147 (5,4)	131 (10,2)	<0,05
MDR	63 (1,6)	27 (1,0)	36 (2,8)	<0,05

STP: Sin tratamiento antituberculoso previo; CTP: Con tratamiento antituberculoso previo; H: Isoniacida; R: Rifampicina; MDR: resistencia conjunta, al menos, a la H y R.

Patrones de resistencia a los fármacos antituberculosos

De los 4.006 casos registrados con cultivo positivos y con los resultados de las pruebas de sensibilidad para SIRE, un total de 3.618 (90,3%) resultaron ser sensibles para esos cuatro fármacos (pan-sensibles), mientras que los 384 pacientes restantes presentaron algún tipo de resistencia a los fármacos contra la tuberculosis analizados.

En relación a esos 384 casos con alguna resistencia, en este estudio aparecieron 13 de los 15 posibles patrones de resistencia a los fármacos antituberculosos de primera línea analizados (Tabla 14). De manera global, el 89,3% de las resistencias pertenecían a los patrones de monorresistencia a la Isoniacida (40,9%), monorresistencia a la Estreptomicina (24,4%), resistencia conjunta a la Isoniacida y la Estreptomicina (12,8%), multirresistencia a la Isoniacida y la Rifampicina (6,5%), y multirresistencia conjunta a la Isoniacida, la Rifampicina y la Estreptomicina (5,2%). Estas proporciones relacionadas con las resistencias se mantuvieron constantes tanto en los casos nuevos como en aquellos tratados anteriormente. En el estudio no se registró ningún caso con resistencia única a la Rifampicina y al Etambutol, ni tampoco a la Rifampicina y a la Estreptomicina.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) cuando se comparó la resistencia/sensibilidad a algún fármaco con el hecho (o no) de haber recibido tratamiento previo para la tuberculosis.

La monorresistencia fue el patrón de resistencia más notificado en este estudio. Analizándola con más detenimiento se observó que en la primera mitad del trabajo (de 2006 a 2013) el porcentaje de casos monorresistentes disminuye un 3,1% (Figura 14), luego se incrementa (2,1% más en 2014, y 7,4% más en 2015), y en 2016 su tendencia de notificación vuelve a ser a la baja, teniendo un porcentaje de casos monorresistentes notificados del 7,2%.

Tabla 14. Patrones de resistencia en los 4.006 casos con datos de las pruebas de sensibilidad para SIRE según si han recibido tratamiento previo o no.

Patrón de resistencia	Casos nuevos N (%)	Previamente tratados N (%)	Total N (%)
Total	3.693	313	4.006
Pan-sensible SIRE	3.355 (90,8)	263 (84,0)	3.618 (90,3)
Alguna resistencia	338 (9,2)	50 (16,0)	388 (9,7)
Monorresistencia	237 (6,4)	25 (8,0)	262 (6,5)
H	143 (3,9)	14 (4,5)	157 (3,9)
R	3 (0,1)	0	3 (0,1)
E	8 (0,2)	1 (0,3)	9 (0,2)
S	83 (2,2)	10 (3,2)	93 (2,3)
MDR	44 (1,2)	19 (6,1)	63 (1,6)
H+R	18 (0,5)	7 (2,2)	25 (0,6)
H+R+E	2 (0,1)	3 (1,0)	5 (0,1)
H+R+S	13 (0,4)	7 (2,2)	20 (0,5)
H+R+E+S	11 (0,3)	2 (0,6)	13 (0,3)
Otras polirresistencias	57 (1,5)	6 (1,9)	63 (1,6)
H+E	6 (0,2)	0	6 (0,2)
H+S	43 (1,2)	6 (1,9)	49 (1,2)
H+E+S	3 (0,1)	0	3 (0,1)
R+E	0	0	0
R+S	0	0	0
R+E+S	1 (<0,0)	0	1 (<0,0)
E+S	4 (0,1)	0	4 (0,1)

SIRE= Estreptomina, Isoniacida, Rifampicina, Etambutol; H=Isoniacida; R=Rifampicina; E=Etambutol; S=Estreptomina; MDR=multirresistencia. Polirresistencia: resistencia a más de un fármaco antituberculoso de primera línea, diferente a la asociación de H y R.

En 2016 se registraron un total de 416 pacientes enfermos de tuberculosis, de los cuales nueve (2,2%) presentaron MDR-TB. De ellos, cuatro eran resistentes a la Isoniacida y a la Rifampicina, otros cuatro a la Isoniacida, la Rifampicina y a la Estreptomina, y uno a los cuatro principales fármacos de SIRE. Durante el período total de estudio (2006-2016) se notificaron 63 casos con MDR-TB (promedio de 5,7 casos anuales), llegando a observar el doble de porcentaje de pacientes

multirresistentes al comparar el primer año del estudio con el último (Figura 14). El 94% (63/67) de los casos resistentes a la Rifampicina eran MDR-TB.

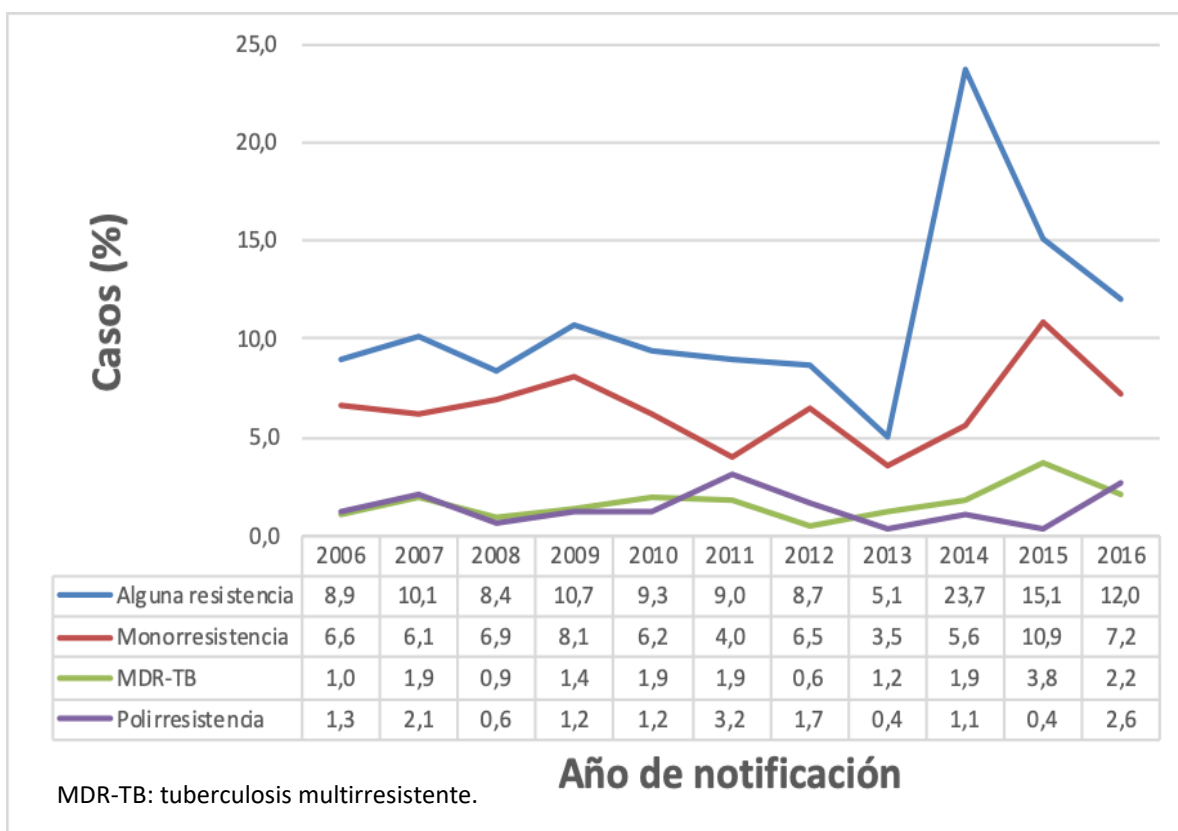


Figura 14. Porcentaje de casos con tuberculosis notificados por año, entre 2006 y 2016, en base al patrón de resistencia farmacológica.

En 2016 se registraron 11 casos de poli-resistencia (resistencia a más de un fármaco antituberculoso de primera línea, diferente a la asociación de Isoniacida y Rifampicina) a los antimicrobianos contra la tuberculosis: uno fue resistente a la combinación de la Isoniacida y el Etambutol, ocho a la Isoniacida y la Estreptomicina, uno a la Isoniacida, a la Estreptomicina y al Etambutol, y uno a la Rifampicina, al Etambutol y a la Estreptomicina. Se observaron oscilaciones a lo largo de los 11 años del periodo de estudio, con porcentajes bajos salvo en 2007, 2011, 2012 y 2016 dónde el porcentaje se incrementó hasta tres veces más de lo habitual (Figura 14). Un total de 3 casos fueron XDR-TB, (uno registrado en 2009 y dos en 2014), presentando resistencia a la Isoniacida, a la Rifampicina, a alguna fluoroquinolona y al menos a un fármaco inyectable de segunda línea.

Resistencia a la Pirazinamida

De los 4.006 casos con datos de sensibilidad a la Isoniacida, a la Rifampicina, al Etambutol y a la Estreptomicina, en 2.925 casos se disponían además de los resultados de las pruebas de sensibilidad a la Pirazinamida. De ellos, 74 (2,5%) presentaron resistencia a la Pirazinamida, siendo 42 monorresistentes a este fármaco. Asimismo, 32 pacientes resultaron ser resistentes a la Pirazinamida y a uno o varios fármacos de primera línea contra la tuberculosis (Tabla 15).

Tabla 15. Resistencia a la Pirazinamida en los 2.925 casos con resultados de las pruebas de sensibilidad para la Isoniacida, Rifampicina, Etambutol, Estreptomicina y Pirazinamida.

Tipo de Resistencia	Casos con algún tipo de resistencia (N)	Total casos (%)
<i>Monorresistencia PZA</i>	42	1,4
<i>MDR+PZA</i>	21	0,7
H+R+PZA	2	0,1
H+R+E+PZA	2	0,1
H+R+S+PZA	8	0,3
H+R+E+S+PZA	8	0,3
<i>Polirresistencia PZA</i>	11	0,4
H+PZA	2	0,1
R+PZA	0	-
E+PZA	1	<0,1
S+PZA	1	<0,1
H+E+PZA	1	<0,1
H+S+PZA	4	0,1
H+E+S+PZA	1	<0,1
R+E+PZA	0	-
R+S+PZA	0	-
R+E+S+PZA	0	-
E+S+PZA	1 (<0,1)	<0,1

PZA=Pirazinamida; MDR=multirresistencia; H=Isoniacida; R=Rifampicina; E=Etambutol; S=Estreptomicina.

Entre 2006 y 2016, el promedio de pacientes resistentes a la Pirazinamida fue de 7 (0,2%) casos por año, siendo 2016 el año con más casos (19) registrados, seguido de 2011 con 11 casos. En relación a los 74 pacientes incluidos en el estudio y que presentaron resistencia fenotípica a la Pirazinamida, 43 (58,1%) procedían de España, mientras que los 31 (41,9%) casos restantes eran extranjeros. El análisis de estas y

CAPÍTULO 2: Evolución de las resistencias en España (2006-2016)

otras características socio-demográficas como el sexo, la edad, el tratamiento previo, localización principal y tipo de resistencia quedan reflejados en la Tabla 16 y en la Tabla 17.

Tabla 16. Principales características socio-demográficas de los 74 casos con resistencia a la Pirazinamida, en función del país de procedencia (2006-2016).

Variable	País de procedencia		Valor p
	España	Otro	
	N (%)	N (%)	
Total	43 (58,1)	31 (41,9)	
Sexo			
Hombre	27 (57,4)	20 (42,6)	Referencia
Mujer	16 (59,3)	11 (40,7)	0,879
Edad			
Menores (0-17 años)	0	2 (100)	0,365
Adultos (18-64 años)	24 (45,3)	29 (54,7)	Referencia
Mayores (>65 años)	19 (100)	0	<0,05
Convivencia			
Familia	36 (64,3)	20 (35,7)	Referencia
Vive solo	4 (66,7)	2 (33,3)	0,907
Grupo	2 (22,2)	7 (77,8)	<0,05
Indigente	0	1 (100)	0,311
Prisión	1 (50)	1 (50)	0,683
Consumo tabaco			
No fumador	16 (47,1)	18 (52,9)	Referencia
Fumador	13 (54,2)	11 (45,8)	0,594
Ex-Fumador	14 (87,5)	2 (12,5)	<0,05
Alcohol			
No	32 (57,1)	24 (42,9)	Referencia
Sí	11 (64,7)	7 (35,3)	0,766
Drogas			
No	42 (59,2)	29 (40,8)	Referencia
Sí	1 (33,3)	2 (66,7)	0,394
VIH			
No	43 (58,9)	30 (41,1)	Referencia
Sí	0	1 (100)	0,378
Otras inmunosupresiones			
No	36 (58,1)	26 (41,9)	Referencia
Sí	7 (58,3)	5 (41,7)	0,986
Tratamiento previo			
No	39 (58,2)	28 (41,8)	Referencia
Sí	4 (57,1)	3 (42,9)	0,956
Localización principal			
Pulmonar	35 (62,5)	21 (37,5)	Referencia
Extrapulmonar	8 (44,5)	10 (55,5)	0,181

Tabla 17. Principales características socio-demográficas de los 74 casos resistentes a la Pirazinamida (2006-2016) según el tipo de resistencia.

Características	Tipo resistencia		Valor p
	Monorresistencia	Polirresistencia	
	Pirazinamida	Pirazinamida	
	N	N	
Total	42 (58,8)	32 (43,2)	
Sexo			
Hombre	26 (55,3)	21 (44,7)	Referencia
Mujer	16 (59,3)	11 (40,7)	0,742
Edad			
Menores (0-17 años)	1 (50)	1 (50)	0,979
Adultos (18-64 años)	26 (49,1)	27 (50,9)	Referencia
Mayores (>65 años)	15 (78,9)	4 (21,1)	<0,05
Convivencia			
Familia	35 (62,5)	21 (37,5)	Referencia
Vive solo	4 (66,7)	2 (33,3)	0,841
Grupo	1 (11,1)	8 (88,9)	<0,05
Indigente	1 (100)	0	0,718
Prisión	1 (50)	1 (50)	0,723
País procedencia			
España	30 (69,8)	13 (30,2)	Referencia
Otro	12 (38,7)	19 (61,3)	<0,05
Consumo tabaco			
No fumador	24 (70,6)	10 (29,4)	Referencia
Fumador	10 (41,7)	14 (58,3)	<0,05
Ex-Fumador	8 (50)	8 (50)	0,161
Alcohol			
No	31 (55,4)	25 (44,6)	Referencia
Sí	11 (61,1)	7 (38,9)	0,668
Drogas			
No	39 (54,9)	32 (45,1)	Referencia
Sí	3 (100)	0	0,252
VIH			
No	42 (57,5)	31 (42,5)	Referencia
Sí	0	1 (100)	0,396
Otras inmunosupresiones			
No	32 (51,6)	30 (48,4)	Referencia
Sí	10 (83,3)	2 (16,7)	0,106
Tratamiento previo			
No	41 (61,2)	26 (38,8)	Referencia
Sí	1 (14,3)	6 (85,7)	<0,05
Localización principal			
Pulmonar	26 (46,4)	30 (53,6)	Referencia
Extrapulmonar	16 (88,9)	2 (11,1)	<0,05

Resultado del tratamiento

De los 4.006 casos analizados, un total de 882 (22%) tuvieron que prolongar su tratamiento más tiempo por la aparición de resistencias (77%; 680/882), toxicidad (20,9%; 184/882), incumplimiento de la terapia farmacológica (1,6%; 14/882) o interacción con otra medicación (0,5%; 4/882). Excluyendo los 882 pacientes en los que el resultado final no se supo, los 3.124 casos restantes no tuvieron que prolongar la terapia farmacológica, y el resultado del tratamiento se dividió en satisfactorio (tratamiento completado y curación del paciente) y en no satisfactorio (abandono, fracaso terapéutico, traslado, pérdida del paciente o fallecimiento) que representaron el 86,4% (2.699/3.124) y el 13,6% (425/3.124), respectivamente. La distribución anual de tratamientos satisfactorios fue la siguiente: 90,2% en 2006, 85,5% en 2007, 84,5% en 2008, 84,8% en 2009, 81,4% en 2010, 83,7% en 2011, 85,1% en 2012, 87,6% en 2013, 90,6% en 2014, 89,7% en 2015, y 85,7% en 2016.

En cuanto a los 63 casos con MDR-TB, en 10 (15,9%) se optó por el uso de tres fármacos antituberculosos, en 33 (52,4%) pacientes se empleó una combinación de cuatro antituberculosos, y en los 20 (31,7%) casos restantes el facultativo se decantó por otros tratamientos. De los pacientes multirresistentes tratados con tres fármacos, la evolución y el resultado final fue satisfactorio en uno de ellos (10%), mientras que en siete pacientes el tratamiento se tuvo que prolongar, y en los dos casos restantes no se pudo valorar ya que se perdió el seguimiento por traslado de los pacientes. En los casos en los que se utilizaron cuatro fármacos, el resultado final fue satisfactorio en cuatro (12,1%) de ellos, se prolongó en 23 (69,7%), y en seis se perdió el seguimiento del paciente: en cinco debido a su traslado a otro domicilio, y en otro caso por fallecimiento del mismo durante el tratamiento. Por último, en referencia a los casos en quienes se utilizaron otros tratamientos, su evolución y resultado final fue satisfactorio en 2 (10%) pacientes, mientras que en 15 (75%) pacientes el tratamiento se tuvo que prolongar, y en tres se perdió el seguimiento del paciente: en dos debido a su traslado a otro domicilio, y en otro caso por fallecimiento.

En 882 (22,0%) casos fueron necesarios cambios en la pauta terapéutica por diversos motivos: 680 por la aparición de resistencias, 184 por toxicidad, 14 por incumplimiento del tratamiento y cuatro por interacciones con otra medicación. Los

cambios englobaron alargamiento del tratamiento y la adición/supresión de antibióticos.

Discusión

Los datos obtenidos en este estudio de 2006 a 2016 mostraron bajos porcentajes de resistencia a algún fármaco contra la tuberculosis en España (9,7%), así como bajos niveles de MDR-TB (1,6%) si se compara con los datos expuestos por la OMS a nivel mundial (4,1%) y el ECDC en Europa (3,8%) [WHO Tuberculosis Report 2019; ECDC 2018]. Durante el periodo de estudio, se detectaron tres casos XDR-TB (uno en 2009 y dos en 2014), lo cual representó un 4,7% de los casos MDR-TB. Afortunadamente, este dato se encuentra por debajo del expuesto por la OMS, la cual dice que entre el 9 y 10% de los casos MDR-TB son XDR-TB [WHO Tuberculosis Report 2015].

En este estudio, los centros sanitarios de Cataluña, Asturias, Canarias y la Comunidad Valenciana han sido los que han registrado más casos diagnosticados de tuberculosis. En cuanto a los centros de Cataluña y la Comunidad Valenciana, este hecho puede deberse a que son dos de las comunidades con más centros participantes en el estudio, de modo que el registro de pacientes es mayor. La distribución por áreas geográficas de casos resistentes fue similar a la distribución de casos diagnosticados de tuberculosis, destacando los porcentajes de resistencia de los centros hospitalarios de Cataluña, Canarias, Comunidad Valenciana y Andalucía. Tanto las guías nacionales como las internacionales (ECDC y OMS) recomiendan que a todos los casos de tuberculosis confirmados por cultivo se les realice las pruebas de sensibilidad a los fármacos antituberculosos. Sin embargo, los datos obtenidos en este estudio sobre la distribución geográfica de las resistencias no pueden contrastarse debido a que en España esta información sigue sin ser totalmente representativa a nivel nacional.

Con respecto a los resultados de los fármacos antituberculosos individuales, se constataron proporciones de monorresistencia a la Isoniacida y monorresistencia a la Estreptomicina (e incluso altos valores de resistencia conjunta a ambos fármacos), del 3,9% y 2,3%, respectivamente, sobre los 4.006 casos analizados (Tabla 14). Estas proporciones podrían considerarse como bajas, puesto que son inferiores a las presentadas en estudios previos de diversas zonas geográficas en nuestro país: 5,3% y

3,0% de Gutiérrez-Aroca *et al* en 2018., y 7,4% y 16,9% de Aznar *et al.* en 2005, respectivamente. Sin embargo, esta alta proporcionalidad de monorresistencia para estos dos fármacos con respecto al resto de antituberculosos probablemente sea debida a su uso histórico: ya en la década de 1950, cuando se introdujeron los primeros antibióticos contra la tuberculosis, pronto se desarrolló resistencia a la Estreptomicina cuando se usaba sola [Youmans 1946]. Para abordar este problema se desarrollaron tratamientos combinados asociando Estreptomicina con Isoniacida, terapia que generó un exceso de confianza en su administración ambulatoria sin supervisión y que condujo a la aparición de resistencia a la Isoniacida (y algunos pacientes también a la Estreptomicina) en la década de 1960 [Jindani 1976]. A pesar de que la Estreptomicina se ha incluido tradicionalmente dentro de los fármacos antituberculosos de primera línea, no se utiliza en la terapia estándar inicial contra la tuberculosis sensible por la importante toxicidad que conlleva y las molestias en su administración, aunque tampoco es despreciable el porcentaje de resistencia conjunta con la Isoniacida. Sin embargo, estos datos corroboran que la retirada de la Estreptomicina como fármaco de primera línea en España por sus efectos adversos tiene una baja relevancia debido a los altos niveles de resistencia presentes en la población. Por todo ello, sigue siendo necesaria una mayor vigilancia en la resistencia a la Estreptomicina. En cuanto a la resistencia asociada a la Rifampicina (1,7%), esta fue también menor que lo publicado en la literatura para España: Remacha *et al.* obtuvieron un 3,8%, Aragón *et al.* un 2,6% y Aznar *et al.* un 2,5%. En consonancia con esto, los datos obtenidos en este estudio en referencia a la resistencia al Etambutol (1,0%) fueron inferiores a los obtenidos en estudios previos, donde se publicaron datos del 3,9% [Aragó 2006] y del 3,3% [Aznar 2005]. Por el contrario, la resistencia a la Pirazinamida (2,5%) que se observó fue sólo ligeramente superior al estudio de Gutiérrez-Aroca *et al.*, que obtuvieron un 2,2% para este fármaco. También es resaltable que el porcentaje de casos con monorresistencia a la Pirazinamida fue casi cuatro veces superior respecto a aquellos casos con polirresistencia a este mismo fármaco (42/2925 que representa un 1,4%, y 11/2925 que representa un 0,4%, respectivamente). Es bastante significativo el dato que hace referencia a aquellos casos resistentes a la Pirazinamida en mayores de 65 años, debido a que todos ellos eran españoles (Tabla 16). Además, en esa franja de edad, los casos con

monorresistencia a la Pirazinamida fueron muy superiores a los de polirresistencia (Tabla 17). Una hipótesis que podría explicar tal dato es que los españoles de edad avanzada estén relacionados con el sector agropecuario (un tercio de los agricultores y ganaderos españoles tienen más de 65 años) y hayan sido infectados de tuberculosis mediante el contacto con *M. bovis*, microorganismo que es intrínsecamente resistente a la Pirazinamida. Para corroborar dicha hipótesis sería necesario determinar cuál fue la micobacteria aislada en esos pacientes, y en menor medida saber si esas personas tenían alguna relación con la agricultura o ganadería. Desafortunadamente, la base de datos del estudio no contempla el registro de la especie identificada, tan solo si se había aislado un microorganismo perteneciente al complejo *M. tuberculosis*, pero no qué especie en concreto dentro de dicho complejo. A diferencia de otros estudios [Dürr 2013; Gallivan 2015], la monorresistencia a la Pirazinamida fue prácticamente el doble en los casos pulmonares en comparación con los casos extrapulmonares, haciendo hincapié en el hecho de que es necesario disponer de mayores datos sobre la sensibilidad a la Pirazinamida.

Diversos trabajos no notificaron que hubiera relación entre el sexo y la multirresistencia [Demile 2018; Desissa 2018; Gomes 2014; Workicho 2017], en consonancia con los resultados de este estudio. Sin embargo, otros autores sí que indicaron que el sexo se asoció con la presencia de tuberculosis multirresistente, ya sea en hombres [Faustini 2006] o en mujeres [Liu 2013].

Un factor de riesgo asociado a la tuberculosis, ampliamente conocido, es si el paciente ha recibido tratamiento farmacológico con anterioridad, siendo cinco veces mayor el riesgo de padecer MDR-TB al haber sido tratado previamente con antituberculosos según este estudio (Tabla 12). El porcentaje de casos sin tratamiento antituberculoso previo resistentes a la Isoniacida, así como los casos MDR-TB [Faustini 2006; Glasauer 2019; Liu 2013], son buenos indicadores de la transmisión reciente de la enfermedad tuberculosa, siendo la resistencia a la Isoniacida el primer paso para el desarrollo de una multirresistencia (MDR-TB) y una resistencia extendida (XDR-TB). La mayoría de trabajos españoles publicados se han centrado en el estudio de las resistencias primarias, y se dispone de pocos datos sobre las adquiridas; sin embargo,

cuando éstas se han considerado y se han incluido en algún estudio suelen ser, en nuestro medio, más elevadas que las resistencias primarias. Como es sabido, la resistencia inicial o primaria esta relacionada con la capacidad virulenta de la cepa, y es de utilidad para conocer o evaluar la situación epidemiológica de un país (sobre todo la resistencia a la Rifampicina como indicador de multirresistencia). Por otro lado, la resistencia adquirida o secundaria se relaciona con una pauta terapéutica errónea o un incumplimiento de esta por parte del paciente, reflejando así la eficacia de los programas de control contra la tuberculosis que hay en la actualidad. Tal y como describió Crofton *et al.*, la resistencia primaria es menos grave que la secundaria, ya que la primera suele ser monorresistentes, mientras que la segunda suele ser a varios fármacos antituberculosos. La resistencia inicial (o primaria) a la Isoniacida fue del 6,5% en este estudio, ligeramente superior al mostrado en estudios previos (5,7%; Blanquer *et al.*), mientras que la de los casos MDR-TB fue del 1,2%, un dato afortunadamente inferior al 2,7% descrito por el ECDC [ECDC 2018]. Por otro lado, los datos referentes a la resistencia adquirida (o secundaria) a la Isoniacida y MDR-TB fueron del 12,5% y 6,1%, respectivamente, lejos del 22,6% y 12,9% del trabajo de Blanquer *et al.*, así como del 14,4% presentado en el último informe del ECDC [ECDC 2018].

La probabilidad de generar una cepa resistente durante el tratamiento de la enfermedad tuberculosa es máxima en la fase inicial del tratamiento intensivo, cuando la población bacteriana es mayor. El 53,9% de los pacientes estudiados recibieron una pauta terapéutica de cuatro fármacos (Isoniacida, Rifampicina, Pirazinamida y Etambutol), porcentaje similar (52,4%) en los casos con multirresistencia, mientras que el 38,6% lo hizo con una pauta de tres fármacos (Isoniacida, Rifampicina y Pirazinamida), porcentaje que bajó al 15,9% en los casos MDR-TB. Estos datos remarcan el hecho de que en España, a los pacientes nuevos sin enfermedad previa, se les pauta el tratamiento con cuatro fármacos mantenidos hasta conocer el resultado de las pruebas de sensibilidad fenotípicas para evitar el desarrollo de cepas resistentes, tal y como recomienda las guías internacionales de la OMS [WHO Guideline treatment 2017], ya que la incidencia de fracasos, abandonos, resistencia secundaria e incluso

MDR-TB es mayor entre los casos con resistencia inicial que han sido tratados con una pauta de solo tres fármacos [Lew 2008].

La pandemia del VIH y los flujos migratorios desde países de mayor prevalencia a aquellos de menos prevalencia son dos importantes factores asociados al incremento de casos de tuberculosis. El VIH es uno de los factores implicados en el aumento de las tasas de tuberculosis, no solo en los países con rentas per cápita más altas, sino también en los países con menores ingresos [Caylà 1998]. Los dos patógenos, *M. tuberculosis* y el VIH, aceleran conjuntamente el deterioro de las funciones inmunológicas del enfermo. La OMS estima que, de los 10 millones de personas enfermas de tuberculosis en 2019, el 8,2% (820.000) presentaban coinfección por el VIH, y que casi 208.000 personas de los cerca de 1.400.000 fallecidos por tuberculosis eran positivas para el VIH. En nuestro país, la evolución de la tuberculosis está muy relacionada con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, siendo la tuberculosis la segunda enfermedad oportunista más frecuente indicativa de SIDA después de la neumonía por *Pneumocystis jirovecii* [Vigilancia epidemiológica VIH 2019]. A pesar de que en algunos años hasta un 25% de los casos presentaban coinfección por el VIH [Caylà 1998], se aprecia una disminución en el número de casos de tuberculosis en las últimas décadas, en gran medida gracias a la disponibilidad del tratamiento antiretroviral de gran actividad (TARGA) a partir de 1996. El tratamiento mejoró notablemente el estado inmunológico de estos pacientes y, por tanto, su supervivencia. Con ello, los últimos datos disponibles en España muestran que en 2017 se declararon 209 casos de tuberculosis positivos para VIH, lo que supone un 4,8% del total de casos notificados, aunque se estima que mediante la información que se proveyó sobre la infección por el VIH este porcentaje fue realmente del 8,3%, muy similar al de la OMS a nivel mundial [Plan Prevención y control TB 2019]. Las cifras mostradas en este estudio son alentadoras en relación a la coinfección, puesto que, del total de la población analizada, el 4,7% de los casos con tuberculosis era VIH positivos. Sin embargo, se ha mostrado que el hecho de presentar coinfección con el VIH duplica la probabilidad de tener MDR-TB. Por todo ello, es importante seguir insistiendo en las medidas de control y vigilancia, en particular en la población de más riesgo, como en la positiva para el VIH, UDVP y presidiarios.

En nuestra área, si bien la tuberculosis está disminuyendo, esta se manifiesta en formas más complejas y de más difícil tratamiento que, en épocas anteriores, ya que afecta a poblaciones más frágiles como inmunodeprimidos, donde el 9,1% de los casos con tuberculosis positiva analizados en este trabajo presentaban algún tipo de inmunosupresión. Estos pacientes presentan una reducción en su capacidad para combatir ciertas enfermedades o afecciones, debido al cáncer, diabetes, desnutrición, trastornos genéticos o trasplantes, entre otros. En los últimos años, la inmigración ha supuesto otro importante factor de riesgo. Gran parte de los pacientes analizados en este estudio provenían de Rumanía, Bolivia, Pakistán, y Marruecos. Estos, a su vez, también son los principales países de origen de los inmigrantes que vienen a España, siendo Rumanía el principal país del continente europeo, Bolivia representa el tercer país con más inmigrantes en España que provienen de América, Pakistán el segundo país asiático y Marruecos el principal de África [Extranjeros España 2019]. La procedencia de los inmigrantes y la presencia de casos de tuberculosis en España es de gran relevancia, especialmente aquellos provenientes de Pakistán, donde la prevalencia de esta enfermedad es elevada, ya que este país representa el 5,7% de los casos mundiales de tuberculosis, además de ser uno de los países con más personas afectadas de MDR-TB [WHO Tuberculosis Report 2020]. La inmigración, tradicionalmente, se ha mencionado como uno de los factores que incrementan la prevalencia de MDR-TB en los países europeos [Espinal 2001]. El aumento de la inmigración desde países con elevados porcentajes de resistencias primarias o adquiridas debería obligar a reforzar la vigilancia sobre la presencia de cepas resistentes. Los resultados de este estudio indican que los inmigrantes (9,6%) tienen dos veces más resistencia primaria a la Isoniacida que la población autóctona (5,0%), lo que remarca la necesidad de que el tratamiento en los casos iniciales de este colectivo se base en cuatro fármacos, al menos en pacientes que proceden de países con una alta incidencia de resistencias a este antimicrobiano. Si bien es cierto que la resistencia a la Pirazinamida era inferior en este grupo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el país de procedencia y el tipo de resistencia a la Pirazinamida (Tabla 17). Este fármaco, que forma parte de los antituberculosos de primera línea, debería seguir teniéndose en consideración en los estudios de resistencias a pesar de las dificultades técnicas que presenta su determinación

fenotípica. En cuanto a los casos multirresistentes, los resultados indican que el porcentaje de casos resistentes en la población inmigrante (2,8%) es casi el triple respecto a la autóctona (1,0%) y hay hasta casi tres veces más riesgo de padecer una MDR-TB cuando la persona proviene del extranjero en relación a los españoles (Tabla 12). Esta asociación cobra mayor fuerza al observar los casos MDR-TB con (11,1%) y sin tratamiento previo (2,1%) en este grupo poblacional (Tabla 13). A pesar de que estos datos no son tan alarmantes como sucede en otros países de la Unión Europea [Glasauer 2019], estos resultados respaldan la recomendación de la OMS de iniciar el tratamiento de la MDR-TB con cuatro fármacos: una fluoroquinolona, un inyectable y dos fármacos del grupo C [WHO Guideline treatment 2017] y no confiar en ningún otro fármaco de primera línea hasta que estén disponibles los resultados de las pruebas de sensibilidad fenotípicas. Además, hay que tener en cuenta si la resistencia es inicial o adquirida, ya que un tercio de los casos MDR-TB registrados habían recibido tratamiento antituberculoso con anterioridad.

Otro de los factores de riesgo que parecen estar asociados a la multirresistencia es el tipo de convivencia, más concretamente el hecho de convivir en grupo, no tener domicilio propio (indigente) o estar en prisión, suponiendo un riesgo de entre cuatro y seis veces más de adquirir una tuberculosis multirresistente (Tabla 12 y Tabla 17). Varios estudios [Anibarro 2004; Story 2007] han analizado la importancia de determinados factores de riesgo social con la tuberculosis, y apuntan a que uno de los principales motivos es su mala adherencia al tratamiento, generando posteriores resistencias en estos casos. Observando los pacientes que conviven en grupo, los que eran indigentes y los que estaban en prisión, el tratamiento no se cumplió en el 8,7%, 15,8%, y 8,5%, respectivamente. Estos datos contrastan con casi el 3% de abandono cuando el paciente enfermo de tuberculosis convive con su familia. Para tratar de disminuir estos datos, es de gran importancia supervisar la administración del tratamiento en estos pacientes, y tal y como se ha mencionado con anterioridad, el uso de la terapia observada directamente.

Este estudio presenta una serie de limitaciones. La primera y más importante es que se fundamenta en una base de datos de la SEPAR, y aunque incorpora una gran

cantidad de centros sanitarios representantes de muchas provincias y Comunidades Autónomas, no alcanza a cubrir la totalidad de la población española. Por otro lado, para que los investigadores incluyan casos en la base de datos, éstos han de ser miembros de la SEPAR. Además, la inclusión de casos requiere el consentimiento informado de los pacientes. Por ello, la inclusión de casos anuales en la base de datos ha demostrado ser muy dispar. Esta variabilidad de casos introducidos probablemente sea debida al bajo número de casos con resistencia existente, pero también, a la concurrencia de varios estudios en momentos diferentes que han utilizado esta base de datos: el estudio RETUBES (2010-2011), y el estudio REMOTUBES (2016-2018). Precisamente 2011 y 2016 son dos de los años con una mayor inclusión de casos, seguramente debida a la finalización e inicio de estos dos estudios, resaltando la implicación de los colaboradores en dichos proyectos.

En conclusión, las proporciones generales de resistencia a los medicamentos y MDR-TB en España son bajas. Los datos obtenidos en este estudio sugieren que la multirresistencia, un fenómeno que surgió en la década de 1950 en respuesta a los primeros antibióticos empleados contra la tuberculosis, continúa representando un desafío en el siglo XXI. Un diagnóstico microbiológico de la resistencia más rápido y preciso, basado en sistemas mejorados capaces de reducir los tiempos de detección de días o semanas a cuestión de horas, es esencial para combatir la MDR-TB. Aunque el porcentaje de resistencia de la MDR-TB siguen siendo relativamente bajo en nuestro medio, es fundamental vigilar de cerca y de forma constante todos estos casos, para poder actuar rápidamente y evitar su diseminación en nuestra sociedad.

CAPÍTULO 3

Evaluación del Xpert MTB/RIF Ultra para la detección simultánea de *Mycobacterium tuberculosis* complex y de la resistencia a la Rifampicina en muestras extrapulmonares baciloscopia-negativa

Perez-Risco D, Rodriguez-Temporal D, Valledor-Sanchez I, Alcaide F. Evaluation of the Xpert MTB/RIF Ultra assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in smear-negative Extrapulmonary Samples. J Clin Microbiol. 2018. 56. DOI: 10.1128/JCM.00659-18.





Evaluation of the Xpert MTB/RIF Ultra Assay for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Smear-Negative Extrapulmonary Samples

 Daniel Perez-Risco,^{a,b,c}
 David Rodriguez-Temporal,^{a,b,c}
 Ivan Valledor-Sanchez,^{a,b}
 Fernando Alcaide^{a,b,c,d}

^aDepartment of Microbiology, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, Spain

^bDepartment of Pathology and Experimental Therapy, Universitat de Barcelona, Hospitalet de Llobregat, Spain

^cMycobacterial Infections Study Group (GEIM) of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC), Madrid, Spain

^dTuberculosis Investigation Unit of Barcelona (FUITB), Barcelona, Spain

ABSTRACT The rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTUBC) in clinical samples is essential for successful treatment. New techniques such as real-time PCR have been developed in order to facilitate rapid diagnosis, but their sensitivity is low in extrapulmonary specimens, due to the low bacillary load in such samples. A next-generation assay has recently been developed to try to overcome this limitation. The aim of this study was to analyze the effectiveness of the Xpert MTB/RIF Ultra (GX-Ultra) for the detection of MTUBC DNA in 108 smear-negative extrapulmonary specimens that were MTUBC culture positive. In addition, 40 extrapulmonary culture-negative samples and 20 samples with nontuberculous mycobacteria were tested to evaluate the specificity of the assay. All samples were collected between May 1999 and May 2017. The GX-Ultra detected DNA of MTUBC in 82 extrapulmonary specimens that were MTUBC culture positive (75.9% sensitivity; 95% confidence interval [CI], 66.6 to 83.4%). The assay was negative for all clinical specimens that were MTUBC culture negative and the samples with nontuberculous mycobacteria (100% specificity). Furthermore, two (1.8%) samples presented mutations related to rifampin resistance. The highest sensitivity was obtained in samples of lymph nodes (94.1%) and nonsterile fluids (93.7%), followed by tissue specimens (86.6%), stool material (80%), abscess aspirates (64.7%), and sterile fluids (60.5%). Pleural fluids, one of the least optimal samples for detecting DNA of MTUBC, were GX-Ultra positive in 10/21 (47.6%) of cases. In summary, GX-Ultra showed excellent specificity and high sensitivity in paubacillary specimens, making it a useful tool for rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis.

KEYWORDS extrapulmonary tuberculosis, molecular diagnosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Xpert MTB/RIF Ultra

Tuberculosis (TB) is a major public health problem in terms of morbidity and mortality worldwide, with 6.3 million new cases reported and an estimated incidence of 10.4 million in 2016. The extrapulmonary form of the disease represented 15% of the notified cases (1), and its frequency of presentation markedly increased in cases of immunodeficiency.

The microbial diagnosis of TB has traditionally been carried out using two different procedures: (i) direct smear microscopy of the sample (Ziehl-Neelsen and/or auramine-rhodamine stain), which is quick, inexpensive, and simple but has poor sensitivity, especially in nonrespiratory samples (2), and (ii) mycobacterial culture, which despite being considered the gold standard technique for TB diagnosis can take several weeks to provide a confirmation (3, 4). New molecular methods have thus been developed to

Received 19 April 2018. Returned for modification 17 May 2018. Accepted 20 June 2018.

Accepted manuscript posted online 27 June 2018.

Citation Perez-Risco D, Rodriguez-Temporal D, Valledor-Sanchez I, Alcaide F. 2018. Evaluation of the Xpert MTB/RIF Ultra assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in smear-negative extrapulmonary samples. *J Clin Microbiol* 56:e00659-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00659-18>.

Editor Geoffrey A. Land, Carter BloodCare & Baylor University Medical Center

Copyright © 2018 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Fernando Alcaide, falcaide@bellvitgehospital.cat.

improve TB control, with the most sensitive ones being those based on nucleic acid amplification (5).

One of these methods is the Xpert MTB/RIF assay (Cepheid, Sunnyvale, CA), which is based on a real-time PCR that utilizes molecular beacon technology to simultaneously detect DNA of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTUBC) and rifampin (RIF) resistance conferred by the *rpoB* gene mutation. This molecular system, endorsed by the WHO in 2010 (6), has been demonstrated to be a useful tool for the detection of pulmonary TB (7, 8); however, its sensitivity for extrapulmonary samples remains a challenge due to their low bacillary load (9).

The recently developed next-generation Xpert MTB/RIF Ultra (GX-Ultra; Cepheid) assay aims to overcome the limitations of its predecessor by increasing the sensitivity for detection of MTUBC DNA when few bacilli are present in a clinical sample (10). This new and fully automated nested real-time PCR assay differs from its predecessor in several ways: the larger PCR chamber with a total capacity of 50 μ l, in contrast to 25 μ l in the previous cartridge (10), the incorporation of two different multicopy targets (*IS1081* and *IS6110* insertion sequences), and the optimization of PCR and thermal-cycling parameters. The results are provided automatically in 77 min if the genetic material is amplified or in 66 min if it is not. The system classifies MTUBC detection in the following semiquantitative results: high, medium, low, very low, and a new category named trace, and it classifies RIF resistance as detected, not detected, or indeterminate.

The aim of the present work was thus to evaluate the effectiveness of GX-Ultra for direct detection of MTUBC DNA in smear-negative extrapulmonary samples.

MATERIALS AND METHODS

Samples and mycobacterial identification. A total of 168 smear-negative extrapulmonary samples (Table 1), obtained from 148 adult patients and collected between May 1999 and May 2017, were analyzed in the Department of Microbiology at the Hospital Universitari de Bellvitge (Barcelona, Spain). Nonsterile samples were pretreated using an *N*-acetyl-L-cysteine-NaOH digestion-decontamination procedure (11), with a final volume of 2 ml, whereas sterile fluids were directly processed. Biopsy samples were previously disaggregated and resuspended in 2 ml of saline solution. In all cases 1 ml of the samples was frozen at -80°C until later use. The remaining volume was processed as follows: (i) smear microscopy for acid-fast organisms (Ziehl-Neelsen and/or auramine-rhodamine stain) and (ii) mycobacterial culture in solid (Löwenstein-Jensen) and liquid media (Bactec MGIT 960; Becton Dickinson, Towson, MD). The smear microscopy and the culture tests were done at the time of collection of the specimens. Mycobacterial identification was carried out using the DNA AccuProbe (Gen-Probe Inc., San Diego, CA), BIO-LINE SD Ag MPT64 TB test (Standard Diagnostics, Yongin, South Korea), and Genotype *Mycobacterium* CM/MTBC (Hain Lifescience, Nehren, Germany).

Among the samples studied, 108 were MTUBC culture positive (including three *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin). Sixty clinical samples (one sample per patient) were also included to test the specificity of the assay, divided into 40 clinical samples that were culture negative and 20 that were culture positive for nontuberculous mycobacteria (NTM) covering a total of 18 species.

Xpert MTB/RIF Ultra assay. The GX-Ultra assay was performed according to the manufacturer's instructions (12). Briefly, frozen samples were thawed and 2 ml of the sample reagent was added to 1 ml of the clinical specimens (2:1 ratio) in order to inactivate them. The tube containing the sample was then incubated at room temperature for 15 min and vortexed once for 7 to 8 min. Then 2 ml of the volume was transferred to the test cartridge and inserted into the GeneXpert instrument.

Time to culture positivity and effect of freezing duration. This study also examined the relationship between the results obtained by GX-Ultra and (i) the prolonged preservation of frozen samples, which were divided into specimens frozen for less than 5 years (freezing starting at 2013 to 2017), between 5 and 10 years (2008 to 2012), between 10 and 15 years (2003 to 2007), and more than 15 years (1999–2002), and (ii) bacillary load, analyzing the time to positivity of cultures in days for extrapulmonary samples in liquid media.

Statistical analysis. A chi-squared test and a Student *t* test were performed to determine whether the duration of freezing of the samples and the time to growth of the mycobacteria had any impact on the results obtained, respectively. A *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant. Sensitivity and specificity values were calculated at the 95% confidence interval (CI) for GX-Ultra, using the mycobacterial culture as the reference standard.

RESULTS

GX-Ultra detected DNA of MTUBC in 82 smear-negative extrapulmonary specimens that were MTUBC culture positive (75.9% sensitivity; 95% CI, 66.6 to 83.4%). The positive results obtained using this technique were classified as follows: medium ($n = 15$), low

TABLE 1 Results obtained by the Xpert MTB/RIF Ultra assay according to the source and MTUBC culture of the specimens

Clinical sample	Total no. of samples	Samples MTUBC culture positive		Sensitivity (%)	Samples MTUBC culture negative		Specificity (%)
		GXU ⁺ ^a	GXU ^{-b}		GXU ⁺	GXU ⁻	
Sterile fluids	44			60.5			100
Pleural fluid	24	10	11	47.6	0	3	
Cerebrospinal fluid	4	3	0	100	0	1	
Joint fluid	9	7	1	87.5	0	1	
Ascitic fluid	3	1	2	33.3	0	0	
Pericardial fluid	4	2	1	66.6	0	1	
Nonsterile fluids	29			93.7			100
Gastric aspirate	5	3	1	75	0	1	
Urine	24	12	0	100	0	12	
Lymph nodes	25	16	1	94.1	0	8	100
Abscess aspirates	20			64.7			100
Cervical abscess	6	4	1	80	0	1	
Skin abscess	6	2	2	50	0	2	
Paravertebral abscess	3	2	1	66.6	0	0	
Osteitis pus	5	3	2	60	0	0	
Tissues	24			86.6			100
Skin biopsy	8	2	0	100	0	6	
Intervertebral disc biopsy	2	2	0	100	0	0	
Bone biopsy	4	2	0	100	0	2	
Pleural biopsy	2	2	0	100	0	0	
Rectal biopsy	1	0	1	0	0	0	
Costal cartilage biopsy	1	1	0	100	0	0	
Liver biopsy	1	1	0	100	0	0	
Cervical tissue	1	1	0	100	0	0	
Mediastinal tissue	1	0	1	0	0	0	
Synovial tissue	3	2	0	100	0	1	
Joint biopsy	18	0	0		0	18	
Stool	8	4	1	80	0	3	100
Total	168	82	26	75.9	0	60	100

^aGXU⁺, positive results from GeneXpert MTB/RIF Ultra.

^bGXU⁻, negative results from GeneXpert MTB/RIF Ultra.

(*n* = 19), very low (*n* = 29), and trace (*n* = 19). There were no specimens in the high category. Two samples (1.8%; included in the low and very low groups) presented mutations related to RIF resistance and showed multidrug resistance (MDR).

The sensitivities of GX-Ultra for different sample groups were as follows (Table 1): 94.1% in lymph nodes, 93.7% in nonsterile fluids, 86.6% in tissue specimens, 80% in stool material, 64.7% in abscess aspirates, and 60.5% in sterile fluids. Ten of 21 (47.6%) pleural fluid samples were GX-Ultra positive for the detection of MTUBC DNA.

GX-Ultra presented a specificity of 100% for the 40 clinical specimens with a negative MTUBC culture and the 20 that were NTM culture-positive (Table 1).

Evaluation of the effect of the duration of freezing of the samples revealed that 16 (80%) of those stored since 2013 to 2017 presented a GX-Ultra-positive result. A positive result was also obtained from 6 (85.7%) samples stored since 2008 to 2012, 36 (75%) since 2003 to 2007, and 24 (72.7%) since 1999 to 2002. There was no significant difference in time to culture positivity between groups (*P* > 0.05).

Regarding the time required for culture-positive growth (Fig. 1), significant differences were found when specimens from the trace category of the GX-Ultra were compared with those from the low (*P* = 0.04) and medium (*P* = 0.003) categories and when comparing the samples in the not-detected category with those in the medium category (*P* = 0.005). The comparison between the not-detected, trace, and very low categories presented few differences, none of which reached statistical significance.

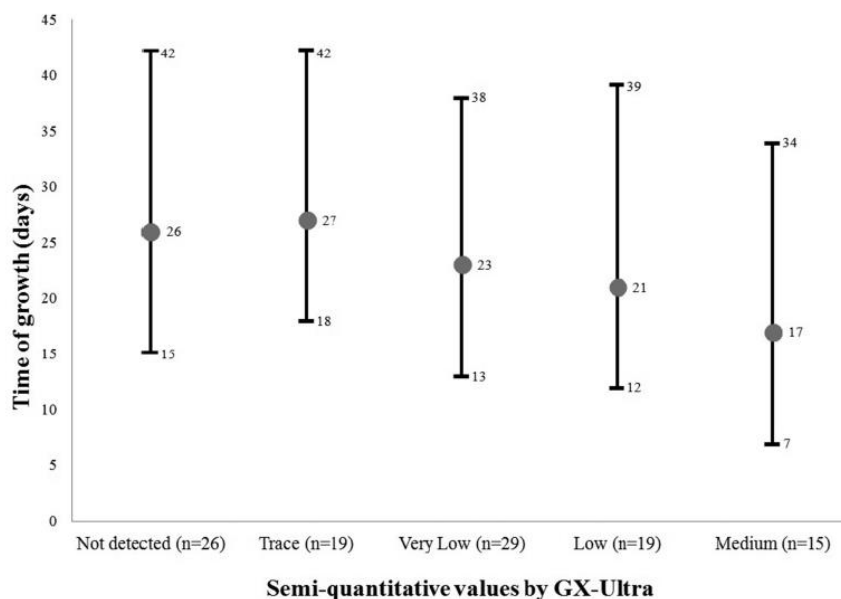


FIG 1 Time required for growth of smear-negative samples, including the average number of days, classified according to the semi-quantitative value provided by the GX-Ultra.

($P = 0.7$ for not detected and trace, $P = 0.1$ for not detected and very low, and $P = 0.08$ for trace and very low). Interestingly, the average times required for culture-positive growth between the not-detected and trace categories were very similar: 26 days (15 to 42) and 27 days (18 to 42), respectively.

DISCUSSION

GX-Ultra has previously been demonstrated to show high sensitivity for the rapid diagnosis of pulmonary TB in adults and children, in addition to HIV-infected patients (13–16). However, to date only one study has analyzed the sensitivity of GX-Ultra in extrapulmonary disease, specifically in tuberculous meningitis (17). In the present study, high sensitivity values were obtained with GX-Ultra in a large variety of extrapulmonary samples, and the results were superior to those of previous studies that applied Xpert MTB/RIF to similar specimens. The improvement was especially notable for lymph nodes, whose sensitivity increased between 17.1 and 23.5% more with GX-Ultra than with its predecessor (9, 18–20). Similarly, the nonsterile fluids obtained sensitivity values 15.7 to 27% higher with the novel assay than with Xpert MTB/RIF (9, 19, 20); in the case of tissue samples, the increase was 20 to 44.9% larger with the GX-Ultra (9, 19). It should be noted that pleural fluids, which are probably the least optimal sample used to detect DNA in MTUBC, presented interesting results. In fact, several studies that used the previous version of the assay, Xpert MTB/RIF, only achieved sensitivity values of 25 to 37% for pleural fluid samples (9, 20–23), while in the current study GX-Ultra detected about half of the culture-positive specimens of MTUBC (Table 1), representing a remarkable improvement.

The increase in sensitivity observed with GX-Ultra might be due mainly to the incorporation of two new targets (*IS1081* and *IS6110*) that can be found in MTUBC (24, 25). These allow detection of the new semi-quantitative category named trace, enabling the assay to detect 16 CFU/ml, in contrast to the 114-CFU/ml limit of detection of Xpert MTB/RIF (26). To achieve this category result, at least one of the probes for *IS1081* or *IS6110* has to be positive with cycle thresholds less than 37 cycles and no more than one *mpoB* probe with cycle thresholds less than 40 cycles (10). Other modifications to the assay, such as a larger PCR chamber in the cartridge, appear to have improved its

sensitivity, while the high-resolution melt technology seems to be able to differentiate silent mutations that confer RIF resistance more efficiently (10, 26). However, we stress that in the current study only two samples presented mutations related to RIF resistance (and showed multidrug resistance) and that as a result, it was impossible to check the new high-resolution melt technology incorporated into the Xpert MTB/RIF Ultra. Additionally, a trace result cannot provide information about RIF resistance, and the results are thus reported as "MTB detected, trace, RIF indeterminate." About a quarter (23.8%) of the positive results in this study corresponded to the trace category. However, this situation probably is not as relevant in low-MDR-TB-incidence settings, such as our study setting, in which not one of the samples categorized as trace showed RIF resistance according to drug susceptibility testing.

The specificity values for specimens that were MTUBC culture negative and NTM samples were excellent (100%) in this study. It is important to note that these results were obtained from a limited number and variety of samples, as well as a few NTM species. In other studies in which GX-Ultra was used, the authors indicated that the increase in sensitivity with this new version came at the expense of a decrease in specificity, specifically in patients with a history of tuberculosis (13, 27) and patients with meningitis (17). They hypothesized that the presence of DNA from MTUBC or intact bacilli could explain the reduction in specificity. However, it is not known with certainty what causes this reduction in specificity. Thus, further studies are needed to evaluate the real specificity of this next-generation assay, especially in paubacillary samples.

With regard to the cryopreservation time of the specimens, GX-Ultra showed a nonsignificant trend for lower sensitivity values in samples frozen for a longer time. Many factors might influence the cryopreservation of clinical TB samples and therefore could explain any variations in sensitivity, e.g., the cooling rate, the sample container, volume of samples, and heat transfer conditions inside the freezer (28).

Although clearly showing an improvement in sensitivity, GX-Ultra is influenced by the bacillary load of the clinical samples. In those that were more paubacillary, the percent sensitivity provided by the technique was lower. This was supported by the finding that the differences between the categories provided by the system (high, medium, low, very low, and trace) and the times required for growth were statistically significant (Fig. 1). On the other hand, the similarity of results observed in time to culture-positive growth between the not-detected and trace categories could be explained by the new and lower analytic limit of detection (threshold) of the trace category. Therefore, as all samples studied were originally culture-positive, it appears that the not-detected category was also at the limit of detection or just below it.

Another important aspect of GX-Ultra is the rapidity of the results. The latest version has a shorter test time (33 min less for a negative result and 45 min less for a positive result if the genetic material is amplified) than the Xpert MTB/RIF. This could be due to the following: a trace and a negative result are provided in a shorter time because the assay analyzes only *IS1081* to *IS6110*; the other semiquantitative categories and RIF resistance detection require more time to finish the test because the assay uses four probes to detect the *rpob* gene.

In summary, GX-Ultra has proven to be a highly sensitive and specific test for the direct detection of MTUBC DNA in smear-negative extrapulmonary samples, which are a challenge due to their low bacillary burden. Therefore, this next-generation assay could be a useful tool for the rapid diagnosis of extrapulmonary TB.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Cepheid, for providing us with the Xpert MTB/RIF Ultra reagents. We declare that we have no conflicts of interest.

REFERENCES

1. World Health Organization. 2017. Global tuberculosis report 2017. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
2. Armand S, Vanhuls P, Delcroix G, Courcol R, Lemaître N. 2011. 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. *J Clin Microbiol* 49:1772–1776. <https://doi.org/10.1128/JCM.02157-10>.
3. Lewinsohn DM, Leonard MK, LoBue PA, Cohn DL, Daley CL, Desmond E, Keane J, Lewinsohn DA, Loeffler AM, Mazurek GH, O'Brien RJ, Pai M, Richeldi L, Salfinger M, Shinnick TM, Sterling TR, Warshauer DM, Woods GL. 2017. Official American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America/Centers for Disease Control and Prevention clinical practice guidelines: diagnosis of tuberculosis in adults and children. *Clin Infect Dis* 64:111–115. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw778>.
 4. Pai M, Flores LL, Pai N, Hubbard A, Riley LW, Colford JM, Jr. 2003. Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification tests for tuberculous meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 3:633–643. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00772-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00772-2).
 5. Alcaide F, Coll P. 2011. Advances in rapid diagnosis of tuberculosis disease and anti-tuberculous drug resistance. *Enferm Infect Microbiol Clin* 29:34–40. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(11\)70016-7](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(11)70016-7).
 6. World Health Organization. 2011. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
 7. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, Allen J, Tahirli R, Blakemore R, Rustomjee R, Milovic A, Jones M, O'Brien SM, Persing DH, Ruesch-Gerdes S, Gotuzzo E, Rodrigues C, Alland D, Perkins MD. 2010. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med* 363:1005–1015. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0907847>.
 8. Helb D, Jones M, Story E, Boehme C, Wallace E, Ho K, Kop J, Owens MR, Rodgers R, Banada P, Safi H, Blakemore R, Lan NT, Jones-López EC, Levi M, Burday M, Ayakala I, Mugerwa RD, McMillan B, Winn-Deen E, Christel L, Dailey P, Perkins MD, Persing DH, Alland D. 2010. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *J Clin Microbiol* 48:229–237. <https://doi.org/10.1128/JCM.01463-09>.
 9. Moure R, Martin R, Alcaide F. 2012. Effectiveness of an integrated real-time PCR method for detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in smear-negative extrapulmonary samples in an area of low tuberculosis prevalence. *J Clin Microbiol* 50:513–515. <https://doi.org/10.1128/JCM.06467-11>.
 10. World Health Organization. 2017. WHO meeting report of a technical expert consultation: non-inferiority analysis of Xpert MTB/RIF Ultra compared to Xpert MTB/RIF. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
 11. Kubica GP, Dye WE, Cohn ML, Middlebrook G. 1963. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 87:775–779. <https://doi.org/10.1164/arrd.1963.87.5.775>.
 12. Cepheid. 2017. Xpert MTB/RIF Ultra: instruction manual. Cepheid, Sunnyvale, CA.
 13. Dorman SE, Schumacher SG, Alland D, Nabeta P, Armstrong DT, King B, Hall SL, Chakravorty S, Cirillo DM, Tukvadze N, Babilshvili N, Stevens W, Scott L, Rodrigues C, Kazi MI, Joloba M, Nakiyingi L, Nicol MP, Ghebrekristos Y, Anyango I, Murithi W, Dietze R, Lyrio Peres R, Skrahina A, Auchynka V, Chopra KK, Hanif M, Liu X, Yuan X, Boehme CC, Ellner JJ, Denkinger CM, Study Team. 2018. Xpert MTB/RIF Ultra for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance: a prospective multicentre diagnostic accuracy study. *Lancet Infect Dis* 18:76–84. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30691-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30691-6).
 14. Zar HJ, Workman L, Nicol MP. 2017. Diagnosis of pulmonary tuberculosis in HIV-infected and uninfected children using Xpert MTB/RIF Ultra, abstr A7610. ATS 2017 International Conference. American Thoracic Society, Washington, DC.
 15. Nicol MP, Workman L, Prins M, Bateman L, Ghebrekristos Y, Mbhele S, Denkinger CM, Zar HJ. 22 February 2018. Accuracy of Xpert MTB/RIF Ultra for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children. *Pediatr Infect Dis J*. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001960>.
 16. Kendall EA, Schumacher SG, Denkinger CM, Dowdy DW. 2017. Estimated clinical impact of the Xpert MTB/RIF Ultra cartridge for diagnosis of pulmonary tuberculosis: a modeling study. *PLoS Med* 14:e1002472. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002472>.
 17. Bahr NC, Nuwagira E, Evans EE, Cresswell FV, Bystrom PV, Byamukama A, Bridge SC, Bangdiwala AS, Meya DB, Denkinger CM, Muzoora C, Boulware DR, Trial Team ASTRO-CM. 2018. Diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF Ultra for tuberculous meningitis in HIV-infected adults: a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 18:68–75. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30474-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30474-7).
 18. Ullah I, Javaid A, Masud H, Ali M, Basit A, Ahmad W, Younis F, Yasmin R, Khan A, Jabbar A, Husain M, Butt ZA. 2017. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance in extrapulmonary tuberculosis and sputum smear-negative pulmonary suspects using Xpert MTB/RIF. *J Med Microbiol* 66:412–418. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000449>.
 19. Zeka AN, Tasbakan S, Cavusoglu C. 2011. Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF assay for rapid diagnosis of tuberculosis and detection of rifampin resistance in pulmonary and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* 49:4138–4141. <https://doi.org/10.1128/JCM.05434-11>.
 20. Penz E, Boffa J, Roberts DJ, Fisher D, Cooper R, Ronksley PE, James MT. 2015. Diagnostic accuracy of the Xpert® MTB/RIF assay for extrapulmonary tuberculosis: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 19:278–284. <https://doi.org/10.5588/ijtld.14.0262>.
 21. Vadwai V, Boehme C, Nabeta P, Shetty A, Alland D, Rodrigues C. 2011. Xpert MTB/RIF: a new pillar in diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 49:2540–2545. <https://doi.org/10.1128/JCM.02319-10>.
 22. Friedrich SO, von Groote-Bidlingmaier F, Diacon AH. 2011. Xpert MTB/RIF assay for diagnosis of pleural tuberculosis. *J Clin Microbiol* 49:4341–4342. <https://doi.org/10.1128/JCM.05454-11>.
 23. Lusiba JK, Nakiyingi L, Kirenga BJ, Kiragga A, Lukande R, Nsereko M, Sseengooba W, Katamba A, Worodria W, Joloba ML, Mayanja-Kizza H. 2014. Evaluation of Cepheid's Xpert MTB/RIF test on pleural fluid in the diagnosis of pleural tuberculosis in a high prevalence HIV/TB setting. *PLoS One* 9:e102702. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102702>.
 24. Sankar S, Kuppanan S, Balakrishnan B, Nandagopal Balaji. 2011. Analysis of sequence diversity among IS6110 sequence of *Mycobacterium tuberculosis*: possible implications for PCR based detection. *Bioinformatics* 26:283–285. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq628>.
 25. van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, van Embden JD. 1992. Insertion element IS1081-associated restriction fragment length polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. *J Clin Microbiol* 30:1772–1777.
 26. Chakravorty S, Simmons AM, Rownecki M, Parmar H, Cao Y, Ryan J, Banada PP, Deshpande S, Shenai S, Gall A, Glass J, Krieswirth B, Schumacher SG, Nabeta P, Tukvadze N, Rodrigues C, Skrahina A, Tagliani E, Cirillo DM, Davidow A, Denkinger CM, Persing D, Kwiatkowski R, Jones M, Alland D. 2017. The new Xpert MTB/RIF Ultra: improving detection of *Mycobacterium tuberculosis* and resistance to rifampicin in an assay suitable for point-of-care testing. *mBio* 8:e00812-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00812-17>.
 27. Theron G, Venter R, Smith L, Esmail A, Randall P, Sood V, Oelfese S, Calligaro G, Warren R, Dheda K. 2018. False-positive Xpert MTB/RIF results retested patients with previous tuberculosis: frequency, profile, and prospective clinical outcomes. *J Clin Microbiol* 56:e01696-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01696-17>.
 28. Shu Z, Weigel KM, Soelberg SD, Lakey A, Cangelosi GA, Lee KH, Chung JH, Gao D. 2012. Cryopreservation of *Mycobacterium tuberculosis* complex cells. *J Clin Microbiol* 50:3575–3580. <https://doi.org/10.1128/JCM.00896-12>.

CAPÍTULO 4

**Evaluación del Anyplex II MTB/MDR/XDR para la
detección rápida de *Mycobacterium tuberculosis*
complex y de las resistencias relacionadas con los
principales fármacos antituberculosos**

Introducción

Según la OMS, se estima que en 2019 enfermaron de tuberculosis 10 millones de personas, de las cuales fallecieron 1,4 millones, siendo por tanto aún uno de los mayores problemas de salud en el mundo. De entre todas las personas enfermas en ese mismo año, la OMS notificó 206.030 casos que presentaron tuberculosis multirresistente (MDR-TB), y de ellos, 11.210 (5,4%) personas además presentaron resistencia a las fluoroquinolonas [WHO Tuberculosis Report 2020]. La repercusión clínica de poseer una cepa resistente es muy importante, ya que puede conllevar una mayor gravedad y expansión de la enfermedad, cambios en el tratamiento (número y tipo de fármacos, y duración de este), una menor tasa de curación y una mayor probabilidad de efectos adversos. Por ello, el diagnóstico rápido de la tuberculosis y la detección de resistencias a los fármacos utilizados para combatirla, son medidas esenciales para reducir la transmisión de la enfermedad y, por lo tanto, lograr su control [Walzl 2018].

El diagnóstico de la tuberculosis se basa en la detección del agente causal (MTUBC). Esto, tradicionalmente, se ha llevado a cabo mediante el examen microscópico (tinción de Auramina y/o Ziehl-Neelsen) y técnicas de cultivo, seguido por métodos fenotípicos. La observación directa en el microscopio es simple, rápida y económica, sin embargo, su sensibilidad es pobre. Por contra, el cultivo micobacteriano es considerado el método de referencia para la identificación de micobacterias por su sensibilidad, además de permitir aislar el microorganismo para posteriores estudios. A pesar de esto, el cultivo presenta el inconveniente de que tarda varias semanas en proporcionar una confirmación por el lento crecimiento de las micobacterias [González-Martín 2010]. Debido a este inconveniente, se han desarrollado pruebas moleculares de gran rapidez y buena sensibilidad a lo largo de los años, especialmente aquellas basadas en la amplificación de los ácidos nucleicos [Alcaide 2011]. Las técnicas que utilizan la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) se fundamentan en la amplificación e hibridación simultánea del producto amplificado mediante sondas complementarias marcadas con fluorescencia.

Entre sus ventajas destacan su especificidad, sensibilidad y rapidez, pudiendo adelantar el diagnóstico de varias semanas a unas pocas horas.

El otro gran pilar fundamental en el diagnóstico, es la detección de resistencias a los fármacos antituberculosos. Esta resistencia se debe principalmente a mutaciones cromosómicas en diferentes genes, causando una alteración en la diana de acción de los medicamentos contra el bacilo tuberculoso. De entre los fármacos de primera línea, destacan por su eficacia la Isoniacida y la Rifampicina. La resistencia a la Isoniacida puede estar asociada a una variedad de mutaciones en uno o diversos genes, aunque la mayoría de los casos se deben a alteraciones en el gen *katG* (responsable del 60-70% de las resistencias a este fármaco), y alteraciones en el gen *inhA* y/o su región promotora. Las mutaciones en el gen *katG* suelen asociarse a un elevado nivel de resistencia fenotípica, siendo el codón 315 el que se encuentra alterado con mayor frecuencia, mientras que aquellas mutaciones vinculadas al gen *inhA* suelen conferir resistencia de bajo nivel [Coll 2005; van Soolingen 2000; Banerjee 1994]. En cuanto a la Rifampicina, la resistencia a este fármaco está relacionada con alteraciones en el gen *rpoB*: más del 95% de las cepas resistentes tienen mutaciones en una zona de 81 pb (27 codones) de la región central del gen [Telenti-Lancet 1993]. Las mutaciones más frecuentes suelen afectar a los codones 526 o 531, las cuales se asocian a un elevado nivel de resistencia, mientras que alteraciones en los codones 511, 516, 518 y 522 suelen conferir una resistencia de bajo nivel a este fármaco [Telenti 1993; Musser 1995; Somoskovi 2001]. Ante la aparición de resistencias a estos fármacos, se tiene que recurrir a los antiguamente denominados fármacos de segunda línea, donde destacan las fluoroquinolonas, y los aminoglucósidos y polipéptidos cíclicos (comúnmente conocidos como fármacos inyectables de segunda línea). En el caso de las fluoroquinolonas, el mecanismo de resistencia más habitual es la aparición de mutaciones en el gen *gyrA* (responsable del 85% de las mutaciones), que confiere resistencia fenotípica de alto nivel [Maruri 2012]. Las resistencias a los fármacos inyectables de segunda línea se asocian en gran medida con mutaciones en el gen *rrs* [Sirgel 2012] y con alteraciones en la región promotora *eis* [Angkanang 2014]. Como es bien sabido, el método de referencia para determinar la resistencia a los fármacos antituberculosos es la prueba de sensibilidad fenotípica, basada en el método de las

proporciones y con determinadas concentraciones críticas de los fármacos. No obstante, esta prueba puede tardar varias semanas en proporcionar resultados concluyentes, debido al crecimiento lento de estos microorganismos. Por ello, en diversas situaciones es necesario poder disponer de resultados rápidos y precisos de las posibles resistencias a los fármacos más relevantes en el tratamiento de la tuberculosis. Así, en los últimos años se han desarrollado varias técnicas moleculares basadas en la RT-PCR que aúnan la detección simultánea del ADN de MTUBC y alteraciones genómicas relacionadas con las resistencias a diversos antimicrobianos en tan solo unas horas. Entre las de mayor éxito destaca el sistema integrado Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, USA) [Boehme 2010; Steingart 2014; Moure 2011; Moure 2012], y su reciente versión ultrasensible, el Xpert MTB/RIF Ultra [Cepheid 2017; Kendall 2017; Dorman 2018; Perez-Risco 2018]. Esta prueba ha revolucionado el diagnóstico en la tuberculosis con una enorme implantación en todo el mundo, fundamentada en su sencillez, rapidez y robustez de los resultados a partir de las muestras clínicas. A pesar de ello, esta RT-PCR integrada presenta una serie de limitaciones: 1) el extracto de ADN no puede volver a ser reutilizado ya que es un sistema cerrado; 2) solo se detectan mutaciones relacionadas con la resistencia a la Rifampicina (RR-TB); 3) permite el diagnóstico de MTUBC pero no indica si en la muestra a analizar hay material genético de otras micobacterias no tuberculosas (MNT); y 4) el precio de la prueba suele ser elevado [Puri 2016]. Aparte del GeneXpert, existen en la actualidad otras técnicas moleculares con similares objetivos, como es la prueba Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (Seegene, Inc., Seoul, South Korea). Se trata de una PCR multiplex que permite detectar ADN de micobacterias directamente de muestras clínicas o desde el cultivo, pudiendo diferenciar MTUBC del conjunto de MNT [Seegene 2014; Perry 2014]. Esta prueba puede complementarse con el Anyplex™ II MTB/MDR/XDR (Seegene), para llevar a cabo la detección de mutaciones relacionadas con la resistencia a los fármacos antituberculosos más importantes de primera y segunda línea [Seegene 2018; Causse 2015; Perez-Garcia 2017]. A diferencia del Xpert MTB/RIF, los “kits” del Anyplex permiten conservar una cantidad de ADN extraído para posteriores re-evaluaciones o análisis, así como poder utilizarse en diversas plataformas y con un menor precio.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el método molecular Anyplex II MTB/MDR/XDR para la detección rápida de MTUBC y de las resistencias relacionadas con los fármacos antituberculosos más importantes de primera y segunda línea, mediante la plataforma de termociclación CFX96.

Materiales y métodos

Muestras y diseño del estudio

Estudio retrospectivo en el que se evaluaron un total de 57 aislamientos clínicos resistentes (uno por paciente), al menos, a uno de los medicamentos antituberculosos de primera línea y pertenecientes al estudio "REMOTUBES" (SEPAR 2016-2019, España). Los centros participantes en el estudio REMOTUBES realizaron el estudio fenotípico mediante el BACTEC MGIT 960 y el VersaTrek. Las concentraciones críticas de los fármacos antituberculosos (puntos de corte), representan las concentraciones más bajas de los diferentes fármacos que inhiben el crecimiento de las cepas sensibles de MTUBC, que nunca han estado expuestas a los mismos, y no inhiben a las cepas resistentes a cada antimicrobiano específico (cepas resistentes). Estas son para el MGIT 960, según recomienda la OMS en la actualidad, las siguientes: 0,1 µg/ml para la Isoniacida, 1 µg/ml para la Rifampicina, 5 µg/ml para el Etambutol, 1 µg/ml para la Estreptomycin, y 100 µg/ml para la Pirazinamida. Para el sistema VersaTrek en los fármacos de primera línea, estas son: 0,1 µg/ml para la Isoniacida, 1 µg/ml para Rifampicina, 5 µg/ml para Etambutol, 2 µg/ml para Estreptomycin, y 300 µg/ml para la Pirazinamida [VersaTrek Myco, Streptomycin, PZA 2010]. Por otro lado, también fue posible analizar las concentraciones críticas en los fármacos de segunda línea. En el caso de resistencia a la rifampicina y/o dos fármacos de primera línea deberían realizarse pruebas de sensibilidad a los fármacos de segunda línea. Las concentraciones críticas propuestas por la OMS para estos fármacos con el método MGIT960 son: 1 µg/ml para la Amikacina, 2,5 µg/ml para la Capreomicina, 5 µg/ml para la Etionamida, 1 µg/ml para el Levofloxacin, 1 µg/ml para el Linezolid, 0,25 µg/ml para el Moxifloxacin (aunque 1 µg/ml es el punto de corte clínico propuesto), 1 µg/ml para la Clofazimina y 0,5 µg/ml para la Rifabutina. Para otros fármacos no están totalmente establecidas las concentraciones críticas con este método en medio líquido

(MGIT960) y así se suelen aplicar equivalencias de otros métodos y medios. En el caso de la Kanamicina se utiliza la concentración de 2,5 µg/ml [Schön 2020], mientras que para el Ácido Paraminosalicílico se ha sugerido 4 µg/ml. Así pues, del total de aislamientos clínicos analizados (N=57), se observaron resistencias a la Isoniacida (n=36), Estreptomycin (n=37), Rifampicina (n=13), Pirazinamida (n=7), y al Etambutol (n=5). De todos estos, 11 presentaron resistencia fenotípica conjunta al menos a la Isoniacida y a la Rifampicina (MDR), y uno fue XDR, mostrando resistencia fenotípica a la Isoniacida, Rifampicina, Estreptomycin, Pirazinamida, Kanamicina, Levofloxacino, y Rifabutina. A todos los aislamientos se les realizó en el Servicio de Microbiología del Hospital de Bellvitge el estudio molecular de resistencias con el Anyplex II MTB/MDR/XDR, utilizando la plataforma de termociclación CFX96, y también mediante el GenoType, utilizando la prueba MTBDR*plus* v2.0 y MTBDR*sl* v2.0 cuando esta fue necesaria.

GenoType

El estudio molecular de resistencias con el GenoType (Hain-Lifescience, Nehren, Germany) se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, para la amplificación de ADN micobacteriano mediante una PCR-hibridación reversa en tiras de nitrocelulosa que contienen las sondas con secuencias naturales (*wildtype*) y las sondas con los codones más frecuentemente alterados. Se utilizó el GenoType MTBDR*plus* v 2.0 que permite detectar mutaciones relacionadas con la resistencia a la Rifampicina (RIF; mutaciones en el gen *rpoB*) y la Isoniacida (INH; mutaciones en los genes *katG* e *inhA*), así como el GenoType MTBDR*sl* v 2.0 para la detección de las mutaciones relacionadas con las resistencias a las fluoroquinolonas (FLQ; mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB*) y a los aminoglucósidos (AMG; mutaciones en los genes *rrs* y *eis*), respectivamente (Tabla 18).

Anyplex

Todos los aislamientos clínicos también fueron analizados mediante el Anyplex™ II MTB/MDR/XDR (Seegene, Korea, Seoul), utilizando la plataforma de termociclación CFX96 (Bio-Rad, CA), con el fin de comparar los resultados con los obtenidos por el GenoType. Esta versión del Anyplex, permite detectar simultáneamente material genético de MTUBC y su resistencia a fármacos antituberculosos de primera línea y

segunda línea, cubriendo mutaciones en el gen *katG* y la región promotora del gen *inhA* (INH), *rpoB* (RIF), *gyrA* (FLQ), y el gen *rrs* y la región promotora *eis* (AMG). La amplificación de los ácidos nucleicos mediante el Anyplex se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante [Seegene 2018].

Esta PCR-multiplex tarda una hora en realizar la extracción de ADN y tres horas en amplificar el ADN, generando unos resultados que el propio software interpreta de manera automática y que son exportables. La técnica utiliza oligonucleótidos de cebado dual, así como tecnología de escisión y extensión de oligonucleótidos ya marcados. El Anyplex requiere de cinco controles de calidad: un control negativo, un control interno de amplificación, un control que determina la presencia de material genético de MTUBC, un control positivo para MTUBC que indique sensibilidad y no resistencia (*wild type MTUBC sensitive control*), y un control positivo que es una cepa XDR que alberga todas las mutaciones cubiertas por el ensayo.

La PCR de esta técnica se realiza en dos tubos independientes. En el primer tubo se detecta la presencia de ADN de MTUBC (MTB/MDR) y la resistencia a la Isoniacida (capaz de detectar siete mutaciones) y a la Rifampicina (permite la detección de 18 mutaciones). Por otro lado, en el segundo tubo se detectaría la presencia de ADN de MTUBC (MTB/XDR) y la resistencia a las fluoroquinolonas (identifica siete mutaciones) y a los aminoglucósidos (detecta seis mutaciones). Las mutaciones relacionadas con la resistencia a los citados fármacos que este método es capaz de detectar están resumidas en la Tabla 18.

Tabla 18. Mutaciones asociadas a la resistencia detectadas por los métodos moleculares estudiados.

Técnica molecular	Fármaco	Gen	Mutación	
GenoType MTBDRplus v 2.0	Rifampicina	<i>rpoB</i>	D516V H526Y, H526D S531L	
		<i>katG</i>	S315T1, S315T2	
	Isoniacida	<i>inhA</i>	C-15T A-16G T-8A, T-8C G88A, G88C	
		Fluoroquinolonas	<i>gyrA</i>	A90V S91P D94A, D94N, D94Y, D94G, D94H
GenoType MTBDRs/ v 2.0	Aminoglucósidos		<i>gyrB</i>	N538D E540V A1401G
		<i>rrs</i>	C1402T G1484T G-37T C-14T	
	Aminoglucósidos	<i>eis</i>	C-12T G-10A C-2A	
Anyplex II MTB/MDR/XDR	Rifampicina	<i>rpoB</i>	L511P Q513K, Q513L, Q513P Delección de 3 aminoácidos en 513-516 D516V, D516Y S522L, S522Q H526C, H526D, H526L, H526N, H526R, H526Y S531L, S531W	
		<i>katG</i>	L533P S315, S315N, S315T1, S315T2	
	Isoniacida	R.P. <i>inhA</i>	C-15T T-8A, T-8C A90V	
		Fluoroquinolonas	<i>gyrA</i>	S91P D94A, D94G, D94H, D94N, D94Y
	Aminoglucósidos		<i>rrs</i>	A1401G C1402T G1484T G-37T
		R.P. <i>eis</i>	C-14T G-10A	

R.P.: Región promotora

Secuenciación del ADN

En caso de discrepancia entre los resultados de las dos técnicas moleculares, se realizó la secuenciación de los genes alterados asociados a la resistencia, utilizando los cebadores indicados en la Tabla 19. Las condiciones de la PCR para *katG* y *rpoB* fueron las siguientes: 95°C durante 1 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 seg, hibridación a 57°C durante 30 seg, y elongación a 72°C durante 1 min, seguido de una extensión final de 72°C durante 10 min [Xia 2017]. Por otro lado, para el gen *rrs* se utilizaron las siguientes condiciones: 94°C durante 9 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 seg, hibridación a 65°C durante 30 seg, y elongación a 72°C durante 90 seg, seguido de una extensión final de 72°C durante 10 min [Villemas 2013].

Tabla 19. Cebadores utilizados para la secuenciación del ADN para el gen *rpoB* y *rrs*.

Gen	Nombre	Secuencia del cebador (5'-3')	Tamaño del producto (pb)
<i>katG</i>	Forward <i>katG</i>	AACGACGTCGAAACAGCGGC	455
	Reverse <i>katG</i>	GCGAACTCGTCGGCCAATTC	
<i>rpoB</i>	Forward <i>rpoB</i>	CTTGACACGAGGGTCAGACCA	543
	Reverse <i>rpoB</i>	ATCTCGTCGCTAACCACGCC	
<i>rrs</i>	Forward <i>rrs</i>	TGCACACAGGCCACAAGGGA	1.037
	Reverse <i>rrs</i>	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	

pb: Pares de bases

Resultados

El Anyplex detectó el 94,4% (34/36) de los aislamientos resistentes a la Isoniacida, presentando 27 de ellos mutaciones en el gen *katG*, seis en el gen *inhA* y uno en ambos genes. Por contra, el GenoType logró detectar todos los casos resistentes para este fármaco (100%; 36/36), además de permitir saber en qué lugar del genoma se encontraba la mutación, localizándose 25 casos en S315T1 y cuatro en S315T2 para aquellas con el gen *katG* mutado, cuatro en C15T y dos en T8A en aquellas con el gen *inhA* alterado, y en el único caso con ambos genes alterados el GenoType mostró que las mutaciones se encontraron en S315T1 para el gen *katG* y T8A para el gen *inhA*.

CAPÍTULO 4: Evaluación del Anyplex II MTB/MDR/XDR

Todas las mutaciones que detectó el Anyplex, se correlacionaron con el resultado proporcionado por el GenoType (Tabla 20). Las dos mutaciones que no detectó el Anyplex, pero sí el GenoType se hallaron en el gen *katG* (S531T1).

Tabla 20. Evaluación de la detección de mutaciones por el Anyplex MTB/MDR/XDR en comparación al GenoType MTBDR*plus/sl*

Fármaco	Resultados Anyplex ^a	Resultados GenoType ^b	
		Sensible	Resistente
Isoniacida	Sensible	0	2
	Resistente	0	34
Rifampicina	Sensible	0	2
	Resistente	0	11
MDR	Sensible	0	2
	Resistente	0	9
Fluoroquinolonas	Sensible	0	0
	Resistente	0	4
Inyectables de segunda línea	Sensible	1	0
	Resistente	0	1

^aAnyplex MTB/MDR/XDR; ^bGenoType MTBDR*plus* y/o GenoType MTBDR*sl*; ^cNo Determinable; MDR; resistencia, al menos, a la Isoniacida y a la Rifampicina

En el caso de la Rifampicina, las pruebas de sensibilidad fenotípicas realizadas con el BACTEC MGIT 960 mostraron que 13 de las 57 cepas incluidas en el estudio presentaron resistencia a este fármaco antituberculoso. De ellas, el Anyplex detectó resistencias moleculares en 11 (84,6%), mientras que el GenoType MTBDR*plus* logró detectar resistencias en todas ellas (Tabla 20). En cuanto a las mutaciones, todas se encontraron en el gen *rpoB* de la Rifampicina: 11 (84,6%) en el codón 531, y dos (15,4%) en el codón 526. Las dos mutaciones que no se detectaron con el Anyplex, pero sí mediante el GenoType, se localizaron en la posición 531 y 526 del gen *rpoB*. De igual modo que sucedió con la Isoniacida, todas las mutaciones que detectó el Anyplex se correlacionaron con las proporcionadas por el GenoType MTBDR*plus*.

En total, 11 aislamientos fueron identificados fenotípicamente como multirresistentes (MDR-TB). El Anyplex detectó mutaciones en nueve (81,8%) de ellos

(Tabla 20), todos con alteraciones en el gen *katG* de la Isoniacida y en el gen *rpoB* de la Rifampicina. Por contra, el MTBDR $plus$ detectó mutaciones en los 11 aislamientos MDR (100%): todos con mutaciones en S315T del gen *katG* de la Isoniacida, y para la Rifampicina en nueve casos las alteraciones estaban en S531L y en dos en H526Y del gen *rpoB*. Las dos mutaciones no identificadas con el Anyplex se correspondían con alteraciones el gen *rpoB* (una en S531L y una en H526Y). A excepción de estos dos casos, los resultados entre ambas técnicas se correlacionaron.

En lo referente a la Estreptomicina, las pruebas fenotípicas indicaron que 37 aislamientos eran resistentes a este fármaco. Las dos técnicas moleculares estudiadas no lograron identificar ninguna resistencia para este medicamento. De modo similar sucedió con el Etambutol y la Pirazinamida, dónde se detectaron cinco y siete aislamientos resistentes con el método fenotípico, respectivamente, pero las pruebas moleculares no identificaron ninguna resistencia para estos fármacos.

De los 57 aislamientos analizados que presentaron alguna resistencia a los fármacos de primera línea, se realizó el estudio de sensibilidad fenotípico para fluoroquinolonas en 22 de ellos, siendo cuatro resistentes al Levofloxacino. La sensibilidad del Anyplex y del GenoType para detectar resistencias a las fluoroquinolonas fue del 100% en esos cuatro casos, todos con alteraciones en el gen *gyrA* (dos en A90V, una en S91P y una en D94G).

En cuanto a los aminoglucósidos de segunda línea y péptidos policíclicos (Amikacina, Kanamicina y Capreomicina), se realizó el estudio de sensibilidad fenotípico en 29 de los 57 aislamientos clínicos contemplados en el estudio, presentando resistencia dos (6,9%) de ellos: uno a la Amikacina y uno a la Kanamicina. La sensibilidad de las técnicas moleculares fue del 50% para este grupo de fármacos, puesto que en el caso de la Kanamicina sí que se detectó resistencia a este fármaco con mutación en el gen *eis*, concretamente en G37T. No obstante, en el caso de la Amikacina (resistente fenotípicamente), tanto el Anyplex como el GenoType revelaron sensibilidad a este fármaco. Ante esta discrepancia de resultados, se optó por la secuenciación, que mostró la presencia de una mutación en el gen *rrs*, concretamente en C491T (Tabla 21).

Un aislamiento clínico fue fenotípicamente identificado como XDR-TB, siendo así identificado tanto el Anyplex como el GenoType: se detectaron mutaciones el gen *rpoB* (S531L) de la Rifampicina, el gen *katG* (S315T1) de la Isoniacida, el gen *gyrA* (A90V) de las fluoroquinolonas y el gen *eis* (G37T) de los inyectables de segunda línea.

Tal y como indica la Tabla 20, hubo discrepancias entre las dos técnicas moleculares empleadas en el estudio. Por un lado, se encontraron cuatro discrepancias entre el Anyplex y el GenoType, relacionadas con la Isoniacida (2) y con la Rifampicina (2), estas últimas a su vez pertenecían a dos cepas MDR-TB, siendo necesaria la secuenciación del ADN para ellas (Tabla 21). Por otro lado, se detectó una discrepancia para los inyectables de segunda línea, si bien es cierto que esta no fue entre ambos métodos moleculares (Tabla 20), sino con el resultado fenotípico de las pruebas de sensibilidad. En este caso también se recurrió a la secuenciación del ADN tal y como se ha mencionado anteriormente, obteniendo los resultados de la Tabla 20.

Tabla 21. Resultados de los aislamientos (N) discrepantes obtenidos por las pruebas de sensibilidad fenotípicas, el GenoType, Anyplex y la secuenciación del ADN

N	Fármaco	Pruebas fenotípicas	Anyplex ^a	GenoType ^b	Secuenciación
1	Isoniacida	R ^c	S ^d	R (<i>katG</i> S351T1)	R (<i>katG</i> S351T1)
2	Isoniacida	R	S	R (<i>katG</i> S351T1)	R (<i>katG</i> S351T1)
3	Rifampicina	R	S	R (<i>rpoB</i> Q513L, Q513P, del514-516, D516Y ó del515)	R (del514-516)
4	Rifampicina	R	S	Hubo falta de desarrollo de banda de mutación R (<i>rpoB</i> S531Q, S531W, o L533P)	R (<i>rpoB</i> S531W)
5	Amikacina	R	S	S	R (<i>rrs</i> C491T)

^aAnyplex MTB/MDR/XDR; ^bGenoType MTBDR*plus* y/o GenoType MTBDR*s*; ^cResistente; ^dSensible

Los resultados se obtuvieron en 4-5 horas con el Anyplex II MTB/MDR/XDR, y en 7-8 horas con el GenoType (MTBDR*plus* y MTBDR*s*).

Discusión

Las pruebas de sensibilidad fenotípicas a los fármacos antituberculosos siguen siendo el método de referencia (*gold standard*) para la determinación de resistencias en los fármacos empleados contra la tuberculosis. Sin embargo, la demora en la obtención de los resultados hace preciso utilizar complementariamente otras metodologías que puedan solventar, en parte, este problema. El uso de técnicas moleculares es cada vez más habitual, sobre todo para reducir el tiempo y proporcionar un diagnóstico presuntivo rápido de la enfermedad y la posible resistencia a determinados antimicrobianos. Aún así, estos siguen presentando una serie de limitaciones, entre las que destaca el hecho de no poder abarcar la totalidad de mutaciones que confieren resistencia a los contra la tuberculosis. No obstante, la OMS recomienda varias técnicas moleculares para detectar alteraciones genéticas relacionadas con la resistencia a diversos fármacos, como por ejemplo el GenoType, ya sea en su versión MTBDR*plus* [Jian 2018] o bien en su versión MTBDR*s*/ [Theron 2016].

En general, los resultados globales del Anyplex II MTB/MDR/XDR para la detección de resistencias son bastante prometedores y satisfactorios. La capacidad de detección de mutaciones relacionadas con la resistencia a la Isoniacida fue notable (94,4%), cerca de la obtenida por el GenoType MTBDR*plus* v 2.0 (100%), y superando los resultados del estudio de Causse *et al.*, (60,5% y 62%, respectivamente). En cuanto a los genes, es importante remarcar la excelente sensibilidad del Anyplex en la detección de alteraciones en la región promotora del gen *inhA*, que fue del 100%, igual que en el GenoType. Mientras que en el caso del gen *katG*, las mutaciones fueron detectadas en el 93,1% de los casos con el Anyplex, y 100% con el GenoType, siendo este un dato de gran interés, debido a que las mutaciones en este gen son responsables del 60-70% de las resistencias a la Isoniacida y se correlacionan con una resistencia fenotípica de alto nivel (Alcaide 2016).

De modo similar sucedió con las sensibilidades obtenidas del estudio de resistencias de a la Rifampicina, con buenos datos obtenidos mediante el Anyplex (84,6%) pero por debajo de la capacidad mostrada por el GenoType (100%). Los dos aislamientos resistentes que no identificó el Anyplex contenían mutaciones en las posiciones H526Y y S531L del gen *rpoB*, dianas que también contempla la prueba

Anyplex II MTB/MDR/XDR. Esos dos aislamientos, a su vez, eran multirresistentes. En relación a este último grupo (MDR), la capacidad de detección mostrada por el Anyplex en este estudio fue claramente inferior a la proporcionada por el GenoType (81,8% y 100%, respectivamente), si bien no es del todo valorable ya que el número total de cepas MDR-TB fue bajo. Así, en otros estudios con un mayor número de aislamientos resistentes a la Rifampicina, la sensibilidad del Anyplex ascendió hasta el 97% [Causse 2015] y el 97,7% [Pérez-García 2017].

En relación a las fluoroquinolonas, tan solo cuatro presentaron resistencia a estos antibióticos según las pruebas de sensibilidad fenotípicas. La capacidad de detección del Anyplex y del GenoType fue excelente, logrando detectar todas las mutaciones en los aislamientos. Esto está en concordancia con los datos obtenidos en el estudio de Causse *et al.* [Causse 2015], donde se incluyeron 21 cepas resistentes a las fluoroquinolonas y la sensibilidad obtenida por el Anyplex también fue elevada y similar a la del GenoType (95,2% y 100%, respectivamente). Sin embargo, en el estudio de Pérez-García *et al.* [Pérez-García 2017] donde sólo se analizaron cinco cepas resistentes a estos fármacos, la sensibilidad fue del 80% con ambas técnicas. Esta diferencia de sensibilidad entre los estudios no es muy valorable debido al bajo número de cepas resistentes a las fluoroquinolonas incluidas. Por otro lado, un aspecto interesante a tener en cuenta, es que el Anyplex analiza una serie de mutaciones importantes (Tabla 18), pero no proporciona información precisa sobre el tipo de mutación en cuestión; tan solo se indica en qué lugar del genoma se encuentra dicha mutación.

En lo que respecta a los aminoglucósidos y péptidos cíclicos (inyectables de segunda línea), la prueba de sensibilidad fenotípica detectó resistencia a la Amikacina en una cepa, y otra a la Kanamicina. Aquí, tanto el Anyplex como el GenoType tan solo lograron detectar la presencia de mutación en un aislamiento, el de la Kanamicina (gen *eis* alterado en posición G37T). A pesar de que la sensibilidad para ambas técnicas moleculares en los inyectables de segunda línea fue baja (50%), la concordancia fue la misma. No obstante, se debe tener en cuenta el bajo número de cepas estudiadas que son resistentes a este grupo de fármacos, tal y como sucede con las fluoroquinolonas y por ello la dificultad de obtener datos robustos y concluyentes.

En el estudio se encontraron, de forma global, cinco discrepancias: cuatro aislamientos con discordancias entre los resultados obtenidos por las dos técnicas moleculares estudiadas, y uno con discordancias entre el resultado del antibiograma y el de las técnicas moleculares, teniendo que recurrir a la secuenciación del ADN para solventar dicha discrepancia (Tabla 21). En primer lugar y para la Isoniacida, el Anyplex no detectó dos cepas resistentes (*katG* S351T1), tal y como sí lo hicieron la prueba de sensibilidad fenotípica, el GenoType y la secuenciación. Esto puede ser debido tanto a errores técnicos como, por ejemplo, aquellos relacionados con las condiciones de incubación o pérdidas en la extracción de ADN, que pudieron afectar a la eficiencia del ensayo. En los otros dos casos, la secuenciación determinó que había una delección y una mutación en el gen *rpoB* para la Rifampicina, tal y como había adelantado el GenoType. Sin embargo, ese sistema molecular no detectó la mutación de manera directa, es decir, por la presencia de una banda de mutación (hibridación específica), sino que lo hizo de modo “indirecto” debido a la ausencia de banda no mutada (*wildtype*). A pesar de que el Anyplex también contempla en su prueba esas alteraciones, lo cierto es que en el análisis no logró identificarlas. La quinta discrepancia se dio en la Amikacina, debido a que el estudio de sensibilidad fenotípico reveló resistencia para este fármaco, pero no así en el caso del Anyplex y del GenoType. No obstante, la secuenciación del ADN indicó que existía una mutación en el gen *rrs* (C491T), alteración no contemplada en las dos técnicas moleculares estudiadas.

Como era de esperar, los resultados para la Estreptomina, Etambutol y Pirazinamida no fueron los deseados, ya que ninguna de las dos técnicas moleculares, por diversos motivos, logró identificar mutaciones asociadas a la resistencia a estos fármacos. En el caso de la Estreptomina, el Anyplex y el GenoType MTBDRs/ v 2.0 contemplan en sus kits las mismas mutaciones (3) para el gen *rrs*. Una posible explicación para este hecho sería que el gen alterado es otro (*rpsL* o *gidB*, por ejemplo), o que las mutaciones se encontraban en dianas diferentes a las contempladas, es decir, que no se localizaban en la posición 1401, 1402 o 1484. En el caso del Etambutol, la versión v 1.0 del MTBDRs/ sí incluye mutaciones para este fármaco (dos mutaciones en el gen *embB*), pero no así la v 2.0, utilizada en este

estudio. A pesar de ello, las mutaciones cubiertas por la primera versión para este antibiótico son pocas, y en estudios similares el porcentaje de sensibilidad logrado para el GenoType es del 57,5% [Jian 2018] y del 63,3% [Javed 2018]. Respecto a la Pirazinamida, el motivo por el que no se detectaron resistencias mediante los métodos moleculares es porque ninguna de las dos técnicas estudiadas incorpora mutaciones para este fármaco.

En cuanto a otras características propias de cada método molecular, el Anyplex proporcionó los resultados más rápidamente que el GenoType, reduciendo el tiempo global en 4-5 horas, debido a que el Anyplex necesita una sola reacción de PCR para cubrir las mutaciones relacionadas con los fármacos antituberculosos de primera y segunda línea, mientras que el GenoType necesita dos reacciones de PCR diferentes. Esta rapidez también se ve reflejada en una menor manipulación y, consecuentemente, en una posible menor probabilidad de contaminación cruzada. El Anyplex, por otra parte, cuenta con un control más (5) que el GenoType (4), así como una interpretación automática de los resultados sin necesidad de utilizar un dispositivo electrónico adicional del fabricante. Otra ventaja que ofrece el Anyplex es que permite analizar un mayor número de muestras por ensayo. El coste general por cada test en ambas técnicas es similar.

Este estudio presenta una serie de limitaciones. Si bien es cierto que todos los aislamientos presentaron resistencia a algún fármaco de primera línea según el método de referencia fenotípico, en este estudio no se ha analizado la especificidad del Anyplex, a diferencia de otros mediante la incorporación de aislamientos sensibles fenotípicamente [Causse 2015; Molina-Moya 2015; Pérez-García 2017]. Por otro lado, el número total de aislamientos estudiados (N=57) no es muy elevado, especialmente en lo referente a los fármacos antituberculosos de segunda línea. Por ello, para este grupo de medicamentos, los resultados han de ser interpretados con cautela. Como era de esperar, otra limitación importante es que las técnicas estudiadas no abarcan la totalidad de las mutaciones descritas en relación a la resistencia a los fármacos de primera y segunda línea.

En conclusión, tanto el Anyplex como el GenoType han demostrado tener una buena capacidad de detección de mutaciones relacionadas con la resistencia a la

Isoniacida, Rifampicina y fluoroquinolonas en el complejo *M. tuberculosis*. Si bien el GenoType detectó alguna resistencia más, el Anyplex fue una técnica diagnóstica más rápida. Por ello, el Anyplex II MTB/MDR/XDR se puede considerar como una herramienta molecular útil para el diagnóstico rápido presuntivo de la MDR-TB y XDR-TB, si bien estos resultados deberán ser siempre confirmados por métodos de sensibilidad fenotípicos.

DISCUSIÓN GLOBAL

1. Estudio de las resistencias a los fármacos y los mecanismos moleculares más frecuentes en *Mycobacterium tuberculosis* complex en España durante el periodo 2016-2018 (Estudio REMOTUBES).

La tuberculosis continúa siendo uno de los grandes retos de salud a nivel mundial. En 2019, según la OMS, 10 millones de personas enfermaron de tuberculosis y causó la muerte de 1,4 millones de personas. Además, la aparición de tuberculosis resistente a los fármacos y su diseminación está constituyendo uno de los mayores problemas para el control de esta enfermedad. En 2019 se estimó que cerca de medio millón de personas tenían una tuberculosis resistente a la Rifampicina, de los cuales el 78% presentaban multirresistencia (MDR-TB). Por ello, desde la OMS se promueven programas de vigilancia continua que permitan analizar la evolución de esta enfermedad y su resistencia farmacológica, con el fin de poder establecer medidas globales para su control.

En España, al ser una enfermedad de declaración obligatoria, cada comunidad autónoma informa de los casos notificados al Centro Nacional de Epidemiología, mediante una red de vigilancia (RENAVE), y de ahí se difunde la información a las Comunidades Autónomas, al Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, al ECDC y a la OMS. No obstante, gran parte de los datos de sensibilidad a los fármacos en la tuberculosis no siempre están disponibles ni declarados y, por ello, no son del todo bien conocidos en nuestro país. Esta situación ha provocado que organismos internacionales como la propia OMS o el ECDC notifiquen datos de España limitados y, en determinados apartados, estimados. En los últimos años se han publicado múltiples estudios puntuales, más o menos representativos a nivel geográfico y/o temporal, que pretendían mostrar una visión más global de la situación de la tuberculosis en España, ya sea aportando datos sobre el nivel de resistencias y/o para determinar qué factores epidemiológicos pudieran estar relacionados. En ellos, se analizaron las resistencias de *M. tuberculosis* en Barcelona entre 1995 y 1997 [Martín-Casabona 2000], en Galicia entre 2001 y 2002 [Pérez del Molino Bernal 2005], o con varios centros españoles en 2006 [Jiménez 2008] o la resistencia a los fármacos contra la tuberculosis de primera línea en nuestro país entre 2010-2011 [Blanquer 2014]. En otros trabajos se estudiaron el impacto de la inmigración en enfermos con tuberculosis

resistente en Castellón entre 1995 y 2003 [Tirado Balaguer 2006] o en la Comunidad de Madrid durante 2003 [Sanz Barbero 2007], o de manera más global se determinaron qué factores pueden estar asociados en la adherencia al tratamiento antituberculoso y la mortalidad [Caylà 2009].

A través del presente estudio REMOTUBES de esta tesis, se quiso aportar una visión global y lo más representativa posible en la actualidad, sobre la resistencia a los fármacos antituberculosos de primera y segunda línea en múltiples áreas geográficas de España. Con ese estudio, además, se pretendió conocer los mecanismos moleculares relacionados con dicha resistencia, algo no realizado anteriormente en el país a esta escala, mediante la colaboración de diversos centros hospitalarios de tercer nivel del territorio español pertenecientes a varias comunidades autónomas.

Los resultados constataron, en líneas generales, unos porcentajes de resistencia bajos a los fármacos antituberculosos (Tabla 8), en consonancia con los resultados de estudios anteriores [Blanquer 2014]. La Isoniacida fue el fármaco con un mayor número de casos resistentes (la mayoría con mutaciones localizadas en el gen *katG*), seguida por la Estreptomicina y la Pirazinamida. En el caso de la Isoniacida y los casos MDR-TB, estos últimos de gran relevancia clínica, se han observado niveles de resistencia inicial similares a los de trabajos anteriores. En cuanto al porcentaje de casos con tratamiento antituberculoso previo, se observó una disminución de los niveles de resistencia en este grupo para la Isoniacida, y niveles estables en los casos MDR-TB. Es muy importante el hecho de saber si el paciente ha sido tratado previamente para la tuberculosis o si bien es la primera vez que recibe tratamiento para esta enfermedad, puesto que el incumplimiento del tratamiento o una terapia farmacológica inadecuada podría conducir a la amplificación y la diseminación de la resistencia a través de la presión selectiva, incrementando el riesgo aparición de cepas multirresistentes y con resistencia extendida [Iseman 1994; Iseman 2007]. Con los datos mencionados anteriormente se puede concluir que el seguimiento del paciente y su tratamiento durante el estudio REMOTUBES fueron eficaces. Así, en cuanto al resultado del tratamiento farmacológico, este fue satisfactorio en cerca del 90% de las ocasiones, resaltando las correctas pautas farmacológicas realizadas por el facultativo y el correcto cumplimiento del tratamiento por parte del paciente en la de los casos.

Las técnicas moleculares comerciales utilizadas consiguieron identificar gran parte de las mutaciones relacionadas con la resistencia, demostrando ser de gran utilidad para los principales fármacos antituberculosos. Por ello, con los datos obtenidos, se puede afirmar que los mecanismos de resistencia observados pueden ser detectados, en una gran proporción y de forma rápida y sencilla, mediante los métodos de diagnóstico molecular disponibles en la actualidad. De este modo, se podría llevar a cabo un diagnóstico rápido de la resistencia en tuberculosis en nuestro medio, en una gran parte de aquellos pacientes en que fuese preciso.

Los principales factores de riesgo asociados a la tuberculosis multirresistente fueron el hecho de haber sido tratado para la tuberculosis con anterioridad, tener coinfección por el VIH, y ser extranjero. De entre esos tres factores de riesgo, el más importante fue el hecho de haber sido tratado previamente con fármacos antituberculosos, como era de esperar, representando un riesgo seis veces mayor de tener MDR-TB respecto a los casos nuevos de tuberculosis. Le siguieron la coinfección por el VIH, con un riesgo tres veces mayor de presentar tuberculosis multirresistente, y la inmigración, tradicionalmente muy ligada a la resistencia en fármacos empleados contra la tuberculosis [Espinal 2001]. Sobre este último factor de riesgo, los resultados (Tabla 8) indicaron que el porcentaje de casos con alguna resistencia fue mayor en la población extranjera (17,9%) que en la autóctona (10,5%), incluso esta diferencia se acrecienta aún más si se observan los casos con resistencia a la Isoniacida y los casos MDR-TB, llegando a ser estos últimos del 4,9% y 0,8%, respectivamente. Una posible explicación a estos hechos podría ser el fenómeno migratorio observado en España en los últimos lustros. Analizando algo más profundamente estos datos (Tabla 8), se observó que la diferencia fue más notoria en los pacientes MDR-TB con resistencia adquirida (tratamiento previo), siendo casi 10 veces superior en extranjeros (29,2%) respecto a los nacidos en España (2,7%).

Con todo, a pesar de que los datos de resistencia a los antimicrobianos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en nuestro país no son muy elevados, diversos aspectos sociales del contexto actual, como los flujos migratorios y la infra-notificación existente de los datos de resistencia, hacen que sea muy necesario, siguiendo las

recomendaciones de la OMS, seguir realizando estudios de sensibilidad a los fármacos en tuberculosis que sean representativos en nuestro país.

2. Estudio evolutivo de las resistencias a los fármacos antituberculosos en España durante el periodo 2006-2016.

A pesar de que la OMS informó recientemente sobre aumentos significativos de la incidencia de la tuberculosis en los países más desarrollados, lo cierto es que la tasa de incidencia y la mortalidad asociada a esta enfermedad disminuyeron un 1,5% y un 29% (2000-2017) según este organismo a nivel mundial, y un 4,1% y 5,5 % (2007-2016) en Europa según el ECDC, respectivamente. Durante el periodo 2003-2017, la OMS cifró que el promedio global de casos resistentes a la Isoniacida era del 7,1% y del 7,9% en función de si habían recibido tratamiento antituberculoso con anterioridad o no. Respecto a la tuberculosis multirresistente (MDR-TB), la OMS notificó en 2019 un total de 206.030 casos MDR-TB en el mundo, lo que supone un incremento del 10% más respecto a los datos del año 2018 [WHO Tuberculosis Report 2020]. Factores como los movimientos migratorios, la infección por el VIH y la crisis económica global están suponiendo, en los últimos años, unas grandes trabas para el control de la tuberculosis.

Ante la carencia de datos amplios y precisos sobre la tuberculosis en España, a lo largo de varios años han surgido algunos estudios de varias sociedades científicas (SEPAR, GEM, UITB) que han pretendido mostrar una aproximación de la verdadera situación de esta enfermedad en nuestro país, aunque pocos han analizado la evolución y la situación de las resistencias. Además, estos comprendieron periodos de tiempo cortos y/o sólo zonas geográficas muy concretas.

Debido a los resultados obtenidos en el estudio REMOTUBES, surgió la idea de realizar un segundo estudio utilizando la misma base de datos, pero englobando un periodo de tiempo mayor (2006-2016), con el objetivo de determinar retrospectivamente cuáles han sido las tendencias de las resistencias a los fármacos contra la tuberculosis y cómo han ido cambiando estas a lo largo de más de una década en España.

Este segundo estudio de la tesis mostró porcentajes bajos de resistencia a algún fármaco antituberculoso entre 2006 y 2016 en nuestro país (9,7%). Centrando la atención en las monorresistencias, aunque la Isoniacida y la Estreptomina fueron las que mostraron las cifras más elevadas de resistencia del estudio, estas son claramente inferiores a los datos aportados en estudios previos en nuestro país aunque delimitados geográficamente [Gutierrez-Aroca 2018; Aznar 2005]. Por otro lado, el patrón de resistencia de mayor impacto fue el de la resistencia conjunta a la Isoniacida y a la Rifampicina (MDR-TB), observándose que la mayoría de los pacientes con esta tuberculosis (86%) no habían sido tratados previamente con medicamentos para la misma. Este dato refuerza el uso de la terapia combinada, incluyendo medicamentos tanto con acción bactericida como bacteriostática [Caminero 2017]. Siguiendo con el análisis de los casos multirresistentes, los niveles obtenidos fueron menores (1,6%) a los presentados a nivel mundial por la OMS (4,1%) y también menores respecto a los niveles europeos presentados por el ECDC (3,8%). Siguiendo con los patrones de resistencia de los casos MDR-TB, 6 de cada 10 presentaron resistencia al menos a tres fármacos de primera línea. Este dato remarca la recomendación propuesta por la OMS de comenzar el tratamiento de la MDR-TB con cuatro medicamentos de segunda línea [WHO Guideline treatment 2017] y no confiar inicialmente en ningún fármaco de primera línea hasta que estén disponibles los resultados de las pruebas fenotípicas de sensibilidad. Si el tratamiento inicial de una tuberculosis no es satisfactorio, esto puede conllevar a una mayor aparición de cepas resistentes y, por lo tanto, un incremento de los niveles de resistencia adquirida en la comunidad.

En este trabajo también se analizaron los resultados relacionados con la resistencia a la Pirazinamida. Durante el período de estudio, a pesar de que no todos los centros realizaron las pruebas de sensibilidad a este fármaco, los datos resaltan el hecho de que había más casos con monorresistencia a la Pirazinamida que con polirresistencia a este fármaco, y que a su vez esta resistencia se dio principalmente en personas mayores de 65 años. La explicación más probable para este dato, tal y como indican Glasauer *et al.* [Glasauer 2019], es que los ancianos españoles estén relacionados con la agricultura y hayan sido infectados de tuberculosis por *M. bovis*, microorganismo que es inherentemente resistente a la Pirazinamida. No obstante, esta

teoría no se puede constatar porque la base de datos del estudio no contempla la identificación exacta de la especie dentro del complejo *M. tuberculosis*.

En relación a si el paciente había recibido tratamiento farmacológico o no con anterioridad, la resistencia inicial (o primaria) a la Isoniacida fue del 6,5% en este estudio, algo superior a la mostrada en trabajos previos (5,7%) [Blanquer 2014], mientras que la de los casos MDR-TB fue del 1,2%, un dato claramente inferior al 2,7% descrito por el organismo oficial europeo [ECDC 2018]. Por otro lado, los datos referentes a la resistencia adquirida (o secundaria) a la Isoniacida y MDR-TB fueron del 12,5% y 6,1%, respectivamente, muy por debajo del 22,6% y 12,9% del trabajo de Blanquer *et al.*, así como del 14,4% presentado en el último informe del ECDC [ECDC 2018]. Todo ello parece apuntar a una disminución de la tuberculosis multirresistente a los fármacos en los últimos años en nuestro país.

Respecto a la infección por el VIH, las cifras mostradas en este estudio son muy interesantes, ya que el 4,7% de los casos con tuberculosis eran VIH sero-positivos, lejos del 8,2% a nivel mundial [WHO TB Report 2020]. No obstante, los datos del estudio muestran que el hecho de presentar coinfección con el VIH duplica la probabilidad de tener MDR-TB. Con ello, es importante remarcar el hecho de que aún persiste una elevada tasa de coinfección por el VIH, lo que obliga a seguir insistiendo en las medidas de control y vigilancia, en particular en la población de más riesgo.

Otro aspecto relevante en la tuberculosis es la inmigración. Así, gran parte de los pacientes analizados en este estudio provenían de Rumanía, Bolivia, Pakistán, y Marruecos, países con alta prevalencia de tuberculosis. De hecho, Pakistán representa el 5,7% de los casos mundiales de tuberculosis, además de ser uno de los países con más personas afectadas de MDR-TB [WHO Tuberculosis Report 2020]. Los resultados de este trabajo indicaron que los inmigrantes (9,6%) tenían dos veces más resistencia primaria a la Isoniacida que la población autóctona (5,0%), lo que remarca la necesidad de que el tratamiento en los casos iniciales de este colectivo se base en cuatro fármacos, al proceder de países con una alta incidencia de resistencias primarias a este antimicrobiano. Y, si hablamos de los casos multirresistentes, nos encontramos que el porcentaje de casos resistentes en la población inmigrante (2,8%) era de casi el triple respecto a la autóctona (1,0%). Además, esta asociación cobró mayor fuerza al

observar los casos MDR-TB con (11,1%) y sin tratamiento previo (2,1%) en los pacientes extranjeros (Tabla 13). Por todo ello, las medidas de atención y control de la tuberculosis tienen que hacer un especial hincapié en este grupo poblacional que, además, es más vulnerable. Todo ello, junto con una mayor vigilancia epidemiológica, contribuiría a disminuir la transmisión de la tuberculosis y muy especialmente de la resistente a los antimicrobianos en nuestro territorio.

Así pues, si bien es cierto que las proporciones generales de resistencia a los antimicrobianos y, especialmente, la multiresistencia en España son bajas, sigue siendo necesario establecer sistemas de vigilancia epidemiológica, multicéntricos y coordinados sobre amplias áreas de población, que permitan incrementar el control en la farmacorresistencia, además de disponer de un diagnóstico microbiológico rápido y preciso que permita reducir el retraso diagnóstico.

3. Evaluación del Xpert MTB/RIF Ultra para la detección simultánea de *Mycobacterium tuberculosis* complex y de la resistencia a la Rifampicina en muestras extrapulmonares baciloscopia-negativa.

El diagnóstico microbiológico de la tuberculosis se ha realizado, de manera tradicional, a través del análisis microscópico de la muestra previamente teñida y el cultivo micobacteriano. Para reducir el tiempo de obtención de los resultados y el consecuente inicio de un correcto tratamiento, a lo largo de los años han surgido diversos métodos, fundamentalmente basados en tecnología molecular. Con el tiempo, y en vista de la fiabilidad de los resultados, la OMS ha ido recomendando el uso de determinadas técnicas moleculares, entre ellas, el Xpert MTB/RIF. La mayoría de las técnicas que se utilizan están indicadas para el diagnóstico directo de la tuberculosis pulmonar a partir de muestras clínicas. Con el tiempo, estas técnicas se han ido utilizando también en el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar, con una menor sensibilidad que en la pulmonar, derivado, fundamentalmente, de una menor carga bacilar presente en las muestras extrarrespiratorias.

En este tercer capítulo que se incluye en esta tesis, se realizó un estudio que ha sido publicado en el Journal of Clinical Microbiology y en dónde se analizó la eficacia de la nueva versión del GeneXpert, el Xpert MTB/RIF Ultra, con una mayor sensibilidad

que su predecesora, utilizando muestras de origen extrapulmonar lo que suponen todo un desafío diagnóstico. El Xpert MTB/RIF ya se había analizado con anterioridad en muestras paucibacilares de origen extrapulmonar por nuestro equipo [Moure 2012] que ha servido de referencia comparativa para el presente estudio. Por otro lado, el Xpert MTB/RIF Ultra ya se ha estudiado para el diagnóstico rápido de la tuberculosis pulmonar en adultos [Dorman 2018; Kendall 2017], niños [Nicol 2018], e incluso en pacientes con VIH [Zar 2017]. Sin embargo, no se había valorado su rentabilidad en muestras paucibacilares para el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar en adultos.

En este trabajo se utilizaron muestras clínicas extrarrespiratorias congeladas, de hasta 18 años de antigüedad, y se seleccionaron aquellas que fueron negativas en la baciloscopia, pero con cultivo positivo para el complejo *M. tuberculosis*. Para aportar una mayor robustez, se estudió también la especificidad de la técnica analizando muestras con ADN micobacteriano, pero no pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* (micobacterias no tuberculosas; MNT), así como muestras clínicas negativas en el cultivo micobacteriano. Los resultados mostraron una notable sensibilidad global (75,9%) en la detección de ADN de *M. tuberculosis* complex y muy especialmente en las muestras de ganglios linfáticos (94,1%), así como en los líquidos no estériles (93,7%) y biopsias de diversos tejidos (86,6%). Estos datos fueron superiores a los de estudios previos con muestras similares, incluido el de nuestro grupo de investigación [Moure 2012]. Un apartado especialmente relevante fue la sensibilidad obtenida en los líquidos pleurales (muy paucibacilares) mediante el Xpert MTB/RIF Ultra, que fue casi el doble (47,6%) que en estudios anteriores con el Xpert MTB/RIF donde osciló entre el 25-37% [Moure 2012; Penz 2015; Vadwai 2011; Friedrich 2011; Lusiba 2014]. En cuanto a la especificidad, esta fue del 100% para las muestras con cultivo negativo de micobacterias y para las muestras que eran cultivo positivo para MNT.

A pesar de que esta técnica molecular es capaz de detectar presuntivamente la resistencia a la Rifampicina, un buen marcador de multirresistencia, en el estudio tan solo dos muestras presentaron mutaciones relacionadas con la resistencia a la Rifampicina ya que fueron los únicos aislamientos MDR-TB del estudio. Ello indica la

necesidad de analizar un mayor número de muestras resistentes a la Rifampicina para poder obtener conclusiones sólidas al respecto.

La principal limitación de este sistema molecular ultra sensible parecer estar ligado al mismo incremento de la sensibilidad, lo que ha conllevado una disminución de la especificidad en determinados casos, tal y como afirman varios estudios [Dorman 2018; Bahr 2018; Theron 2018]. Esto podría ser debido a la presencia de ADN de MTUBC o bacilos intactos en la muestra, aunque ello no tenga significación clínica alguna. A pesar de ello, en la actualidad, no se sabe con certeza qué causa la reducción en la especificidad y sería recomendable llevar a cabo más evaluaciones que se centren en la especificidad real de este método molecular de nueva generación en múltiples y variadas muestras paucibacilares. Otro punto controvertido es el de la nueva categoría semicuantitativa (“Trace”) que incorpora este dispositivo. Esta nueva denominación es la responsable, en gran medida, del incremento de la sensibilidad y que obedece a la incorporación de dos dianas multicopias suplementarias (secuencias de inserción IS1081 e IS6110) a parte del gen *rpoB*. En estos casos de “Trace” en los que apenas detecta el ADN del complejo *M. tuberculosis*, parece que no alcanza a amplificar el gen *rpoB*, y por tanto no puede proporcionar información alguna sobre la posible resistencia a la Rifampicina, notificando los resultados referentes a este fármaco como indeterminados. Afortunadamente, esta situación tiene poca relevancia en áreas con baja incidencia de tuberculosis multirresistente, como sucede en España, tal y como se constató al observar que ninguna de las muestras clasificadas dentro de esta categoría mostró resistencia a la Rifampicina según las pruebas de sensibilidad a los fármacos antituberculosos.

En virtud de los resultados y de la rapidez de la técnica (33 minutos menos para un resultado negativo y 45 minutos menos para un resultado positivo, en comparación a su predecesora), el Servicio de Microbiología del Hospital de Bellvitge implementó el Xpert MTB/RIF Ultra como técnica de rutina en todo tipo de muestras clínicas con baciloscopia negativa o positiva para el diagnóstico de una tuberculosis pulmonar y/o extrapulmonar ante una sospecha clínica media o alta de padecer la enfermedad. Este trabajo, junto con otros 15 estudios, fue incluido en un meta-análisis y revisión sistemática para evaluar la precisión del Xpert MTB/RIF Ultra [Zhang 2020].

4. Evaluación de la técnica molecular Anyplex II MTB/MDR/XDR para la detección de resistencias en *M. tuberculosis* complex.

Con el fin de lograr un diagnóstico rápido de la enfermedad tuberculosa y la resistencia a los antimicrobianos, cada vez es más frecuente el uso de técnicas moleculares que son rápidas, y con una buena sensibilidad y especificidad. Dada la gran cantidad de sistemas presentes en el mercado, la OMS recomienda el uso de algunos de ellos. Algunos ejemplos son el Xpert MTB/RIF, y ahora su versión Ultra, para la detección rápida de MTUBC y resistencia a la Rifampicina en pacientes adultos (recomendados desde 2012 y 2017, respectivamente), el GenoType MTBDR*plus* para la detección de resistencias a la Rifampicina y a la Isoniacida (recomendado desde 2008), y desde el 2016 se recomendó el uso del GenoType MTBDR*s*/ para detectar algunas mutaciones relacionadas con la resistencia a determinados fármacos antituberculosos de segunda línea [Jian 2018]. Entre las ventajas de las técnicas basadas en RT-PCR (Xpert MTB/RIF y Ultra) destaca la posibilidad de visualizar el resultado en tiempo real mediante una gráfica que muestra el grado de fluorescencia emitido en función de la presencia o ausencia de ADN de MTUBC y, sobre todo, la gran rapidez y sensibilidad. Por otro lado, a las pruebas como el GenoType, basadas en una PCR hibridación-reversa permite detectar mutaciones en fármacos de primera y también de segunda línea, en función del kit que se utilice. Sin embargo, estas también cuentan con una serie de limitaciones como son una mayor lentitud y una mayor laboriosidad. Así, en 2014 surgió la prueba Anyplex MTB/NTM [Seegene 2014; Perry 2014], que trata de agrupar varias de las ventajas de ambos métodos y pretende solventar algunas de sus limitaciones. Esta se basa en una PCR multiplex que permite detectar ADN de micobacterias directamente de muestras clínicas o desde el cultivo. Desde 2017 se puede complementar con el Anyplex MTB/MDR/XDR [Seegene 2018; Causse 2015; Perez-Garcia 2017], para la detección de mutaciones relacionadas con la resistencia a los fármacos contra la tuberculosis más importantes de primera y segunda línea. En esta tesis se analizó el Anyplex MTB/MDR/XDR utilizando aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* complex pertenecientes al estudio REMOTUBES (Capítulo 1) y que presentaron resistencia a algún fármaco antituberculoso.

En conjunto, la sensibilidad obtenida con este sistema en la detección de resistencias a la Isoniacida fue muy buena, llegando a superar la de otros estudios [Causse 2015], así como también a la Rifampicina, situándose cerca de la obtenida con el GenoType. En cuanto a los casos multirresistentes (MDR-TB), el Anyplex consiguió buenos resultados, pero aún algo por debajo de los proporcionados por el GenoType. Su sensibilidad fue excelente en aquellas mutaciones relacionadas con el gen *inhA*, y algo más bajas, aunque notables, en la detección de alteraciones que afectan al gen *katG* (dato importante porque la mayoría de sus mutaciones se correlacionan con resistencias de alto nivel a la Isoniacida), así como para el gen *rpoB*. En cuanto a los fármacos de segunda línea, los resultados fueron prometedores en las fluoroquinolonas y pobres en los inyectables de segunda línea. Si bien es cierto que el número total de cepas analizadas fue superior en comparación a estudios similares [Causse 2015; Pérez-García 2017], y que las mutaciones que contempla el Anyplex son muchas y muy variadas (Tabla 18), son necesarios más estudios con un mayor número de casos para determinar la utilidad real de esta técnica molecular, especialmente en las resistencias a los fármacos de segunda línea. El Anyplex incluye muchas de las mutaciones más frecuentes, pero no abarca la totalidad de ellas, como sucedió con los resultados para la Estreptomicina, el Etambutol y la Pirazinamida. Por otro lado, el Anyplex permite analizar más muestras simultáneamente en cada ensayo, reduciendo el tiempo de obtención de resultados en 3-4 horas menos respecto al GenoType, y requiere una menor manipulación técnica, lo que conlleva también una menor contaminación cruzada.

Con todo ello, se puede concluir que si bien la prueba de sensibilidad fenotípica sigue siendo el método de referencia (*gold standard*) para la determinación de resistencias en los fármacos antituberculosos, el Anyplex es una herramienta útil para detectar mutaciones relacionadas con la resistencia a los fármacos más relevantes en el tratamiento de la tuberculosis, sobre todo en la Isoniacida y la Rifampicina, que permitiría la detección rápida de los casos de tuberculosis multirresistente (MDR-TB).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. En el estudio REMOTUBES (2016-2018) se observaron porcentajes de resistencia bajos a los fármacos contra la tuberculosis en nuestro país (13,1%), a pesar de un ligero incremento global en comparación con el estudio previo RETUBES (9,2%).

2. Durante 2016-2018, la Isoniacida fue el fármaco con un mayor número de casos resistentes (algo más de la mitad de ellos con mutaciones en el gen *katG* y un tercio en *inhA*), seguida por la Estreptomina y la Pirazinamida. El porcentaje de resistencia inicial a la Isoniacida fue bastante parecido a estudios previos e inferior en la resistencia adquirida.

3. En ese mismo periodo, la tasa de resistencia a la Rifampicina fue algo superior al estudio RETUBES y en todos los casos hubo mutaciones en el gen *rpoB*. De ellos, el 84% fueron MDR-TB. Los porcentajes de resistencia inicial y adquirida en MDR-TB se mantuvieron en consonancia a los notificados anteriormente.

4. Se observó poca resistencia a las fluoroquinolonas en el periodo 2016-2018, y en dos tercios de estas se encontraron alteraciones en el gen *gyrA*. En todo el estudio REMOTUBES solo se detectó un caso XDR-TB, que había recibido tratamiento antituberculoso previamente y que no fue informado por el ECDC.

5. Los factores de riesgo asociados significativamente a la multirresistencia entre 2016 y 2018 fueron el haber recibido tratamiento previo, ser extranjero y la coinfección por el VIH. El tratamiento farmacológico de la tuberculosis durante esos años de estudio fue satisfactorio en el 88,1% de los casos.

6. En el conjunto del periodo 2006-2016 se observaron tasas bajas de resistencia a los fármacos antituberculosos en España (9,7%). Sin embargo, se detectó un ligero incremento de casos resistentes a lo largo de los años (8,9% en 2006 y 12% en 2016), similar a la de otros países europeos.

7. Durante esos 11 años, los porcentajes de resistencia a la Isoniacida fueron levemente superiores a los de estudios previos en la resistencia inicial pero inferiores en la adquirida.

8. En los casos MDR-TB, los porcentajes medios de resistencia inicial y adquirida, entre 2006 y 2016, fueron menores a los notificados en estudios previos y por el ECDC. Sin embargo, se detectó una tendencia significativa al alza durante el periodo de

estudio, del 1% de multirresistencia en 2006 al 2,2% en 2016. Además, se detectaron tres casos XDR-TB (uno en 2009 y dos en 2014), siendo el 4,7% de los casos MDR-TB, por debajo del 9-10% expuesto por la OMS.

9. Entre 2006 y 2016, el riesgo de padecer una MDR-TB estuvo relacionado, fundamentalmente, con el hecho de ser extranjero, mayor de 50 años, haber recibido tratamiento antituberculoso previamente, el tipo de convivencia (en grupo, sin domicilio propio o en prisión) y la coinfección con el VIH. Durante ese periodo de tiempo, el tratamiento de la tuberculosis fue satisfactorio en el 86,4% de los casos.

10. El sistema de PCR a tiempo real Xpert MTB/RIF Ultra mostró una gran especificidad (100%) y una notable sensibilidad (75,9%) para la detección de ADN de *M. tuberculosis* complex en muestras extrapulmonares. El rendimiento fue magnífico en las muestras de ganglios linfáticos, líquidos no estériles y biopsias de diversos tejidos.

11. Aunque en el líquido pleural el Xpert MTB/RIF Ultra tuvo una sensibilidad del 47,6%, esto supone un gran incremento respecto a estudios anteriores con el Xpert MTB/RIF (25%).

12. La sensibilidad de la prueba de PCR a tiempo real Anyplex II MTB/MDR/XDR, para la detección de resistencias a la Isoniacida y/o Rifampicina en aislamientos clínicos fue excelente (93,1% para el gen *katG*, 100% para el gen *inhA*, y 84,6% para el gen *rpoB*).

13. Los datos preliminares con el Anyplex II MTB/MDR/XDR mostraron una sensibilidad extraordinaria (100%) para la detección de resistencia a las fluoroquinolonas, pero sólo del 50% para los inyectables de segunda línea.

14. Aunque la sensibilidad global de la prueba de PCR e hibridación en fase sólida GenoType fue algo mayor que la del Anyplex, esta última demostró ser un método más rápido y con un menor riesgo de contaminación cruzada.

BIBLIOGRAFIA

Ajbani K, Nikam C, Kazi M, Gray C, Boehme C, Balan C, Shetty A, Rodrigues C. Evaluation of genotype MTBDRs/ assay to detect drug resistance associated with fluoroquinolones, aminoglycosides and ethambutol on clinical sediments. PLoS One. **2012**. 7:e49433. DOI: 10.1371/journal.pone.0049433.

Alba Álvarez LM, García García JM, Pérez Hernández MD, Martínez González S, Palacios Gutiérrez JJ, Red de Laboratorios de Microbiología del SESPA. Utilidad de los métodos fenotípicos y genotípicos en el estudio de resistencias de *Mycobacterium tuberculosis* a fármacos antituberculosos de primera línea. **2017**. Arch Bronconeumol. 53:192-198. DOI: 10.1016/j.arbres.2016.08.011.

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. DOI: 10.1016/S0213-005X(11)70016-7. DOI: 10.1016/S0213-005X(11)70016-7.

Alcaide F, Esteban J, González J, Palacios JJ. Micobacterias. En: Cercenado E, Cantón R, editores. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [9a]. SEIMC. **2005**. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap9a.pdf>

Alcaide F, Esteban J, González J, Palacios JJ. Micobacterias. En: Cercenado E, Cantón R, editores. Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos de determinación de sensibilidad a los antimicrobianos en micobacterias [56]. SEIMC. **2016**. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia56.pdf>

Alcaide F, Peña MJ, Pérez-Risco D, Camprubi D, Gonzalez-Luquero L, Grijota-Camino MD, Dorca J, Santin M. Increasing isolation of rapidly growing mycobacteria in a low-incidence setting of environmental mycobacteria, 1994-2015. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **2017**. 36:1425-1432. DOI: 10.1007/s10096-017-2949-0.

Alcaide F, Pfyffer GE, Telenti A. Role of *embB* in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother. **1997**. 41:1677-1681. DOI: 10.1128/AAC.41.10.2270.

Alcaide J, Altet MN, Plans P, Parrón I, Folguera L, Saltó E, Domínguez A, Pardell H, Salleras L. Cigarette smoking as risk factor for tuberculosis in young adults: a case-control study. *Tuber Lung Dis.* **1996.** 77:112-116. DOI: 10.1016/s0962-8479(96)90024-6.

Alonso M, Palacios JJ, Herranz M, Penedo A, Menéndez A, Bouza E, García de Viedma D. Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* strains with a silent mutation in *rpoB* leading to potential misassignment of resistance category. *J Clin microbiol.* **2011.** 49:2688-2690. DOI: 10.1128/JCM.00659-11.

American Thoracic Society (ATS) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med.* **2000.** 161:S221-247. DOI: 10.1164/ajrccm.161.supplement_3.ats600.

Angkanang S, Therdsak P, Angkana C, Saranya P. Molecular characterization of amikacina, kanamycin and capreomycin resistance in M/XDR-TB strains isolated in Thailand. *BMC Microbiol.* **2014.** 14:165. DOI: 10.1186/1471-2180-14-165.

Anibarro L, Lires JA, Iglesias F, Vilariño C, Baloria A, de Lis JM, Ojea R. Social risk factors for noncompliance with tuberculosis treatment in Pontevedra (Spain). *Gac Sanit.* **2004.** 18:38-44. DOI: 10.1016/s0213-9111(04)71997-4.

Aragó Galindo M, Belda Mira A, Albert Contell A, Serra Sanchís B, Amorós Quiles I, Prat Fornells J, Escorns Trullenque R, González C. *Mycobacterium tuberculosis* resistance in the hospital area of Sagunto from 1999 to 2004. *Rev Clin Esp.* **2006.** 206:376-381. DOI: 10.1157/13090504.

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. *J Clin Microbiol.* **2011.** 49:1772-1776. DOI: 10.1128/JCM.02157-10.

BIBLIOGRAFIA

Arnold C, Westland L, MOWat G, Underwood A, Magee J, Gharbia S. Single-nucleotide polymorphism-based differentiation and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis* from isolates or directly from sputum. Clin Microbiol Infect. **2005**. 11:122-130. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2004.01034.x.

Aznar E, Domingo D, Abanades E, García-Peñuela E, López-Brea M. Resistencia en *Mycobacterium tuberculosis* durante un periodo de cuatro años en un hospital de Madrid. Rev Esp Quimioterapia. **2005**. 18:222-225.

Bahr NC, Nuwagira E, Evans EE, Cresswel FV, Bystrom PV, Byamukama A, Bridge SC, Bangdiwala AS, Meya DB, Denkinger CM, Muzoora C, Boulware DR, Trial Team ASTRO-CM. Diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF Ultra for tuberculous meningitis in HIV-infected adults: a prospective cohort study. Lancet Infect Dis. **2018**. 18:68-75. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30474-7.

Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, Collins D, de Lisle G, Jacobs Jr WR. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Science. **1994**. 263:227-230. DOI: 10.1126/science.8284673.

Barcellini L, Borroni E, Brown J, Brunetti E, Codecasa L, Cugnata F, Dal Monte P, Di Serio C, Goletti D, Lombardi G, Lipman M, Rancoita PM, Tadolini M, Cirillo DM. First independent evaluation of QuantiFERON-TB Plus performance. Eur Respir J. **2016**. 47:1587-1590. DOI: 10.1183/13993003.02033-2015.

Barnard M, Albert H, Coetzee G, O'Brien R, Bosman ME. Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa. Am J Respir Crit Care Med. **2008**. 177:787-792. DOI: 10.1164/rccm.200709-1436OC.

Barry VC, Belton JG, Conalty ML, Denneny JM, Edward DW, O'Sullivan JF, Twomey D, Winder F. A new series of phenazines (rimino-compounds) with high antituberculosis activity. Nature. **1957**. 179:1013-1015. DOI: 10.1038/1791013a0.

Blanquer R, Rodrigo T, Casals M, Ruiz Manzano J, García-García JM, Calpe JL, Valencia E, Pascual T, Mir I, Jiménez MA, Cañas F, Vidal R, Penas A, Caylà JA, Grupo de Trabajo del Programa Integrado de Investigación en Tuberculosis en España. Resistencia a fármacos antituberculosos de primera línea en España durante 2010-11. Estudio RETUBES. Arch Bronconeumol **2014**; pii: S0300-2896(14)00222-1. DOI: 10.1016/j.arbres.2014.06.001.

Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, Allen J, Tahirli R, Blakemore R, Rustomjee R, Milovic A, Jones M, O'Brien SM, Persing DH, Ruesch-Gerdes S, Gotuzzo E, Rodrigues C, Alland D, Perkins MD. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. N Engl J Med, **2010**. 363:1005-1015. DOI: 10.1056/NEJMoa0907847.

Boletín Epidemiológico Semanal. Ampliación de la definición de caso de tuberculosis en la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (I). Bol Epidemiol Semanal. **2003**;11:181-4.

Boletín Epidemiológico Semanal. Ampliación de la definición de caso de tuberculosis en la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (II). Bol Epidemiol Semanal. **2003**;11:193-5.

Boletín Oficial del Estado. Real Decreto 2210/1995 por el que se crea la Red nacional de Vigilancia Epidemiológica. Boletín Oficial del Estado **1996**;(21).

Booniam S, Chaiprasert A, Prammananan T, Leechawengwongs M. Genotypic analysis of genes associated with isoniazid and ethionamide resistance in DMR-TB isolates from Thailand. Clin Microbiol Infect. **2010**. 16:396-399. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02838.x.

Bradley P, Gordon NC, Walker TM, Dunn L, Heys S, Huang B, Earle S, Pankhurst LJ, Anson L, Cesare M, Piazza P, Votintseva AA, Golubchik T, Wilson DJ, Wyllie DH, Diel R, Niemann S, Feuerriegel S, Kohl TA, Ismail N, Omar SV, Smith EG, Buck D, McVean

BIBLIOGRAFIA

G, Walker AS, Peto TEA, Crook DW, Iqbal Z. Rapid antibiotic-resistance predictions from genome sequence data for *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun.* **2015.** 6:10063. DOI: 10.1038/ncomms10063.

Brewer TF. Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guerin vaccine: a meta-analysis of the literature. *Clin Infect Dis.* **2000.** 3:S64-S67. DOI: 10.1086/314072.

Brossier F, Veziris N, Truffot-Pernot C, Jarlier V, Sougakoff W. Molecular investigation of resistance to the antituberculous drug ethionamide in multidrug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2011;** 55(1):355–60. DOI: 10.1128/AAC.01030-10. DOI: 10.1128/AAC.01030-10.

Cabriada V, Villate JI, Cara C. Tuberculina 5 UT PPD RT-23. ¿Se usa correctamente? *Med Clin (Barc).* **2000.** 114:119. DOI: 10.1016/S0025-7753(00)71213-9.

Caminero JA. Actualización en el diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis pulmonar. *Rev Clin Esp.* **2015.** DOI: 10.1016/j.rce.2015.09.005.

Caminero JA. Guidelines for clinical and operational management of drug-resistant tuberculosis. **2013.** International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Paris, France.

Caminero JA, Caylá JA, García-García JM, García-Pérez FJ, Palacios JJ, Ruiz-Manzano J. Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis con resistencia a fármacos. **2017.** *Arch Bronconeumol.* 53:501-509. DOI: 10.1016/j.arbres.2017.02.006.

Caminero JA, Caylá JA, Lara N, Working Group on the Current Status of Tuberculosis in Spain (SEPAR). Evaluation of tuberculosis trends in Spain, 1991-1999. *Int J Tuberc Lung Dis* **2003;**7(3):236-242.

Camus JC, Pryor MJ, Médigue C, Cole ST. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology.* **2002.** 148:2967-2973. DOI: 10.1099/00221287-148-10-2967.

Campbell PJ, Morlock GP, Sikes RD, Dalton TL, Metchock B, Starks AM. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2011**; 55(5):2032–41. DOI: 10.1128/AAC.01550-10.

Canetti G, Froman S, Grosset J, Haudroy P, Langeriva M, Mahler HT, Meissner G, Mitchison DA, Sula L. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull World Health Organ.* **1963.** 29:565-578.

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.

Cardona PJ. A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection. *Infection.* **2009.** 37:80-86. DOI: 10.1007/s15010-008-8087-y.

Cardona PJ. Pathogenesis of tuberculosis and other mycobacteriosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **2018.** 36:38-46. DOI: 10.1016/j.eimc.2017.10.015.

Caulfield AJ, Wengenack NL. Diagnosis of active tuberculosis disease: From microscopy to molecular techniques. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis.* **2016.** 4:33-43. DOI: 10.1016/j.jctube.2016.05.005.

Causse M, Ruiz P, Gutierrez-Aroca JB, Casal M. Comparison of two molecular methods for rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol.* **2011.** 49:1772-1776. DOI: 10.1128/JCM.00491-11.

Causse M, Ruiz P, Gutierrez JB, Vaquero M, Casal M. New Anyplex II MTB/MDR/XDR kit for detection of resistance mutations in *M. tuberculosis* cultures. *Int J Tuberc Lung Dis.* **2015.** 19:1542-1546. DOI: 10.5588/ijtld.15.0235.

Caylà JA, Caminero JA, Rey R, Lara N, Vallés X, Galdós-Tangüis H, Working Group Completion of Tuberculosis Treatment in Spain. Current status of treatment

BIBLIOGRAFIA

completion and fatality among tuberculosis patients in Spain. *Int J Tuberc Lung Dis* **2004**;8(4):458-464.

Caylà JA, Galdós-Tanguis H, Jansa JM, García de Olalla P, Brugal T, Pañella H. Evolución de la tuberculosis en Barcelona (1987-1995). Influencia del virus de la inmunodeficiencia humana y de las medidas de control. *Med Clin (Barc)*. **1998**. 111:608-615.

Caylà JA, Rodrigo T, Ruiz-Manzano J, Caminero JA, Vidal R, García JM, Blanquer R, Casals M, and the Working Group on Completion of Tuberculosis Treatment in Spain (Study ECUTTE). Tuberculosis treatment adherence and fatality in Spain. *Respiratory Research* **2009**; 10:121-125. DOI: 10.1186/1465-9921-10-121.

Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. **2015.** Informe epidemiológico sobre la situación de la tuberculosis en España. Red nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE), Madrid, España. (https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/INFORMES/OTROS%20INFORMES/RENAVE_vigilancia_TB_2015.pdf).

Cepheid. Xpert MTB/RIF Ultra: instruction manual. **2017.** Cepheid, Sunnyvale, CA.

CDC. Updated guidelines for the use of rifabutin or rifampin for the treatment and prevention of tuberculosis among HIV-infected patients taking protease inhibitors or nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Morb. Mortal Weekly Rep*. **2000**; 49: 185-189.

Cheng MP, Abou Chakra CN, Yansouni CP, Cnossen S, Shrier I, Menzies D, Greenaway C. Risk of active tuberculosis in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*. **2017**. 64:635-644. DOI: 10.1093/cid/ciw838.

Claydon MA, Davey SN, Edward-Jones V, Gordon DB. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol*. **1996**. 14:1584-1586. DOI: 10.1038/nbt1196-1584.

CLSI. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard-Second Edition. CLSI document M24-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. **2011**.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. **1998**. 393:537-544. DOI: 10.1038/31159.

Cole ST. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiolog*. **2002**. 148:2919-2928. DOI: 10.1099/00221287-148-10-2919.

Coll P, Aragón LM, Alcaide F, Espasa M, Garrigó M, González J, Manterola JM, Orús P, Salvadó M. Molecular analysis of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from Barcelona. *Microb Drug Resist*. **2005**. 11:107-14. DOI: 10.1089/mdr.2005.11.107.

Collins CH, Grange JM, Yates MD. Identification of species and variants of tubercle bacilli. En: *Organization and practice in tuberculosis bacteriology*. London, Boston: Butterworths and Co Ltd, **1985**; 59-66.

Comas I, Gil A. Next generation sequencing for the diagnostics and epidemiology of tuberculosis. *Enferm Infect Microbiol Clin*. **2016**. 34 Suppl 3:32-39. DOI: 10.1016/S0213-005X(16)30217-8.

Crofton J, Chaulet P, Maher D. Directrices para el tratamiento de la tuberculosis farmacorresistente. WHO/TB/96.210 (Rev.1). **1997**. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

BIBLIOGRAFIA

Cui Z, Wang J, Lu J, Huang X, Hu Z. Association of mutation patterns in *gyrA/B* genes and ofloxacin resistance levels in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from East China in 2009. BMC Infect Dis. **2011**. 11:78. DOI: 10.1186/1471-2334-11-78.

Dannenber AM Jr, Sugimoto M. Liquefaction of caseous foci in tuberculosis. Am Rev Respir Dis. **1976**. 113:257-259. DOI: 10.1164/arrd.1976.113.3.257.

Dannenber AM Jr. Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. Rev Infect Dis. **1989**. 11:S369-378. DOI: 10.1093/clinids/11.supplement_2.s369.

Deiss RG, Rodwell TC, Garfein RS. Tuberculosis and illicit drug abuse: review and Update. Clin Infect Dis. **2009**. 48:72-82. DOI: 10.1086/594126.

Demile B, Amare Z, Shewaye H, Xia S, Guadie A. Risk factors associated with multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) in a tertiary armed force referral and teaching hospital, Ethiopia. BMC Infect Dis. **2018**. 18:249. DOI: 10.1186/s12879-018-3167-9.

Desissa F, Workineh T, Beyene T. Risk factors for the occurrence of multi-drug resistant tuberculosis among patients undergoing multidrug-resistant tuberculosis treatment in East Shoa, Ethiopia. BMC Public Health. **2018**. 18:422. DOI: 10.1186/s12889-018-5371-3.

Devasia R, Blackman A, Eden S, Li H, Maruri F, Shintani A, Alexander C, Kaiga A, Stratton CW, Warkentin J, Tang Y, Sterling TR. High proportion of fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with novel gyrase polymorphisms and a *gyrA* region associated with fluoroquinolone susceptibility. J Clin Microbiol. **2012**. 50:1390-1396. DOI: 10.1128/JCM.05286-11.

Doménech-Sancheza A, Vilab J. Fundamento, tipos y aplicaciones de los arrays de ADN en microbiología clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin. **2004**. 22:46-54. DOI: 10.1016/S0213-005X(04)73030-X.

Domínguez J, Boettger EC, Cirillo D, Cobelens F, Eisenach KD, Gagneux S, Hillemann D, Horsburgh R, Molina-Moya B, Niemann S, Tortoli E, Whitelaw A, Lange C, TBNET; RESIST-TB networks. Clinical implications of molecular drug resistance testing for *Mycobacterium tuberculosis*: a TBNET/RESIST-TB consensus statement. *Int J Tuberc Lung Dis*. **2016**. DOI: 10.5588/ijtld.15.0221.

Dorman SE, Schumacher SG, Alland D, Nabeta P, Armstrong ST, King B, Hall SL, Chakravorty S, Cirillo DM, Tukvadze N, Bablishvili N, Stevens W, Scott L, Rodrigues C, Kazi MI, Joloba M, Nakiyingi L, Nicol MP, Ghebrekristos Y, Anyango I, Murithi W, Dietze R, Lyrio Peres R, Skrahina A, Auchynka V, Chopra KK, Hanif M, Liu X, Yuan X, Boehme CC, Ellner JJ, Denkinger CM, Study Team. Xpert MTB/RIF Ultra for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance: a prospective multicenter diagnostic accuracy study. *Lancet Infect Dis*. **2018**. 18:76-78. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30691-6.

dos Santos APG, Pacheco AG, Staviack A, Golub Je, Chaisson RE, Rolla VC, Kritski AL, Passos SRL, de Queiroz Mello FC. Safety and effectiveness of HAART in tuberculosis-HIV co-infected patients in Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis*. **2014**. 17:192-197. DOI: 10.5588/ijtld.11.0831.

Dürr S, Müller B, Alonso S, Hattendorf J, Laisse CJ, van Helden PD, Zinsstag J. Differences in primary sites of infection between zoonotic and human tuberculosis: results from a worldwide systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. **2013**. 7:e2399. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002399.

Engstrom A, Morcillo N, Imperiale B, Hoffner SE, Jureen P. Detection of first- and second-line drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates by pyrosequencing. *J Clin Microbiol*. **2012**. 50:2026-2033. DOI: 10.1128/JCM.06664-11.

Espasa M, González-Martin J, Alcaide F, Aragón LM, Lonca J, Manterola JM, Salvadó M, Tudó G, Orús P, Coll P. Direct detection in clinical samples of multiple gene mutations causing resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampicin

BIBLIOGRAFIA

using fluorogenic probes. *J Antimicrob Chemother.* **2005.** 55:860-865. DOI: 10.1093/jac/dki132.

Espasa M, Salvado M, Vicente E, Tudo G, Alcaide F, Coll P, Martin-Casabona N, Torra M, Fontanals D, Gonzalez-Martin J. Evaluation of the VersaTREK system compared to the Bactec MGIT 960 system for first-line drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* **2012.** 50:488-491. DOI: 10.1128/JCM.06432-11.

Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L, Boulahbal F, Kim SK, Reniero A, Hoffner S, Rieder HL, Binkin N, Dye C, Williams R, Raviglione MC. Global trends in resistance to antituberculosis drugs. *N Engl J Med.* **2001.** 344:1294-1303. DOI: 10.1056/NEJM200104263441706.

European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe. 2018 data. **2020.** ECDC, Stockholm, Sweden.

European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe. 2017 data. **2019.** ECDC, Stockholm, Sweden.

European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe. 2016 data. **2018.** Stockholm, Sweden.

Faustini A, Hall AJ, Perucco CA. Risk factors for multidrug resistant tuberculosis in Europe: a systematic review. *Thorax.* **2006.** 61:158-163. DOI: 10.1136/thx.2005.045963.

Feng Y, Liu S, Wang Q, Wang L, Tang S, Wang J, Lu W. Rapid diagnosis of drug resistance to fluoroquinolones, amikacin, capreomycin, kanamycin and ethambutol using Genotype MTBDRs/ Assay: A meta-analysis. *PLoS One.* **2013.** 8:e55292. DOI: doi: 10.1371/journal.pone.0055292.

Friedrich SO, von Groote-Bidlingmaier F, Diacon AH. Xpert MTB/RIF assay for diagnosis of pleural tuberculosis. *J Clin Microbiol.* **2011.** 49:4341-4342. DOI: 10.1128/JCM.05454-11.

García-García JM, Blanquer R, Rodrigo T, Caylà JA, Caminero JA, Vidal R, Casals M, Ruiz-Manzano J, the Working Group on Completion of Tuberculosis Treatment in Spain. Social, clinical and microbiological differential characteristics of tuberculosis among immigrants in Spain. *PLoS One.* **2011;**6:ie16272. DOI: 10.1371/journal.pone.0016272.

Gallivan M, Shah N, Flood J. Epidemiology of human *Mycobacterium bovis* disease, California, USA, 2003-2011. *Emerg Infect Dis.* **2015.** 21:435-443. DOI: 10.3201/eid2103.141539.

García-Sierra N, Lacoma A, Prat C, Haba L, Maldonado J, Ruiz-Manzano J, Gavin P, Samper S, Ausina V, Dominguez J. Pyrosequencing for rapid molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol.* **2011.** 49:3683-3686. DOI: 10.1128/JCM.01239-11.

Generalitat de Catalunya. Departament de Salut. Informe anual 2017. Situació epidemiològica i tendència de l'endèmia tuberculosa a Catalunya. **2019.** Departament de Salut, Barcelona, Catalonia, Spain.

Glasauer S, Altmann D, Hauer B, Brodhun B, Haas W, Perumal N. First-line tuberculosis drug resistance patterns and associated risk factors in Germany, 2008-2017. *PLoS ONE.* **2019.** 14:e0217597. DOI: [10.1371/journal.pone.0217597](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217597).

Gomes M, Correia A, Mendonça D, Duarte R. Risk factors for drug-resistant tuberculosis. *Tuberc Res.* **2014.** 2:111-118.

González-Martín J, García-García JM, Anibarro L, Vidal R, Esteban J, Blanquer R, Moreno S, Ruiz-Manzano J. Consensus document on the diagnosis, treatment and prevention of tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **2010.** 28:297. DOI: 10.1016/S1579-2129(10)70061-6.

Grupo de trabajo de los protocolos. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Madrid: Protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica; **2014**.

Grupo de trabajo Plan Prevención y Control de la Tuberculosis. Plan para la prevención y control de la tuberculosis en España. Comisión de Salud Pública del Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social, marzo **2019**.

Grupo de trabajo Plan Prevención y Control de la Tuberculosis. Indicadores año 2018. Comisión de Salud Pública del Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social, diciembre **2019**.

Grupo de trabajo Plan Prevención y Control de la Tuberculosis. Infografía Tuberculosis España 2018. Comisión de Salud Pública del Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social, **2019**.

Gutiérrez-Aroca JB, Ruiz P, Vaquero M, Causse M, Casal M. Surveillance of drug-resistant tuberculosis in Spain (2001-2015). *Microb drug resist.* **2018**. 24:839-843. DOI: 10.1089/mdr.2017.0353.

Hazbón MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, Covatore M, Guerrero MI, Varma-Basil M, Billman-Jacobe H, Lavender C, Fyfe J, García-García L, León CI, Bose M, Chaves F, Murray M, Eisenach KD, Sifuentes-Osornio J, Cave MD, Ponce de León A, Alland D. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2006**. 50:2640-2649. DOI: 10.1128/AAC.00112-06.

Heifets LB, Iseman MD. Radiometric method for testing susceptibility of mycobacteria to pyrazinamide in 7H12 broth. *J Clin Microbiol.* **1985**. 21:200-204.

Helb D, Jones M, Story E, Boehme C, Wallace E, Ho K, Kop J, Owens MR, Rodgers R, Banada P, Safi H, Blakemore R, Lan NT, Jones-Lopez EC, Levi M, Burday M, Ayakaka I, Mugerwa RD, McMillan B, Winn-Deen E, Christel L, Dailey P, Perkins MD, Persing DH,

Alland D. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *J Clin Microbiol.* **2010.** 48:229-237. DOI: 10.1128/JCM.01463-09.

Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Richter E. Application of the Genotype MTBDR assay directly on sputum specimens. *Int J Tuberc Lung Dis.* **2006.** 10:1057-1059.

Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Boehme C, Richter E. Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated GeneXpert MTB/RIF system. *J Clin Microbiol.* **2011.** 49:1202-1205. DOI: 10.1128/JCM.02268-10.

Hillemann D, Haasis C, Andres S, Behn T, Kranzer K. Validation of the FluoroType MTBDR assay for detection of Rifampin and Isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol.* **2018.** 25;56. DOI: 10.1128/JCM.00072-18.

Horne DJ, Kohli M, Zifodya JS, Schiller I, Dendukuri N, Tollefson D, Schumacher SG, Ochodo EA, Pai M, Steingart KR. Xpert MTB/RIF and Xpert MTB/RIF Ultra for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* **2019.** 6:CD009593. DOI: 10.1002/14651858.CD009593.pub4.

Horne DJ, Pinto LM, Arentz M, Lin SY, Desmond E, Flores LL, Steingart KR, Minion J. Diagnostic accuracy and reproducibility of WHO-endorsed phenotypic drug susceptibility testing methods for first-line and second-line antituberculosis drugs. *J Clin Microbiol.* **2013** Feb;51(2):393-401. DOI: 10.1128/JCM.02724-12.

Horsburgh CR Jr, Barry CE 3rd, Lange C. Treatment of tuberculosis. *N Engl J Med.* **2015.** 373:2149-2160. DOI: 10.1056/NEJMra1413919.

Huang YF, Chen SC, Chiang YS, Chen TH, Chiu KP. Palindromic sequence impedes sequencing-by-ligation mechanism. *BMC Syst Biol.* **2012.** 6(Suppl 2):S10. DOI: 10.1186/1752-0509-6-S2-S10.

Huyen Mai NT, Cobelens FGJ, Buu TN, Lan NTN, Dung NH, Kremer K. Epidemiology of isoniazid resistance mutations and their effect on tuberculosis treatment outcomes. *Antimicrob Agents Chemother.* **2013**; 57(8):3620–7. DOI: 10.1128/AAC.00077-13.

Igarashi Y, Chikamatsu K, Aono A, Yi L, Yamada H, Takaki A, Mitarai S. Laboratory evaluation of the Anyplex II MTB/MDR and MTB/XDR tests based on multiplex real-time PCR and melting-temperature analysis to identify *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2017.** 89:276-281. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.08.016.

Imtiaz S, Shield KD, Roerecke M, Samokhvalov AV, Lönnroth K, Rehm J. Alcohol consumption as risk factor for tuberculosis meta-analyses and burden of disease. *Eur Respir J.* **2017.** 50:1700216. DOI: 10.1183/13993003.00216-2017.

Iseman MD. Evolution of drug-resistant tuberculosis: a tale of two species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1994**; 91(7):2428-2429. DOI: 10.1073/pnas.91.7.2428. DOI: 10.1073/pnas.91.7.2428.

Iseman MD. Extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Charles Darwin would understand. *Clin Infect Dis.* **2007**;45(11):1415-1416. DOI: 10.1086.522988. DOI: 10.1086/522988.

Jacobs Jr WR, Barletta Jr RG, Udani R, Chan J, Kalkut G, Sosne G, Kieser T, Sarkis GJ, Hatful GF, Bloom BR. Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. *Science.* **1993.** 260:819-822. DOI: DOI: 10.1126/science.8484123.

Jagielski T, Bakula Z, Roeske K, Kamiński M, Napiórkowaska A, Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z, Bielecki J. Mutation profiling for detection of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother.* **2015.** 70:3214-3221. DOI: 10.1093/jac/dkv253.

Javed H, Bakula Z, Plen M, Hashmi HJ, Tahir Z, Jamil N, Jagielski T. Evaluation of Genotype MTBDR*plus* and MTBDR*s* assays for rapid detection of drug resistance in

extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Pakistan. *Front Microbiol.* **2018.** 9:2265. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02265.

Jian J, Yang X, Yang J, Chen L. Evaluation of the GenoType MTBDR_{plus} and MTBDR_{sl} for the detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* on isolates from Beijing, China. *Infect Drug Resist.* **2018.** 11:1627-1634. DOI: 10.2147/IDR.S176609.

Jick SS, Lieberman ES, Rahman MU, Choi HK. Glucocorticoid use, other associated factors, and the risk of tuberculosis. *Arthritis Rheum.* **2006.** 55:19-26. DOI: 10.1002/art.21705.

Jiménez MS, Casal M. Grupo Español de Micobacteriología. Situación de las resistencias a fármacos de *Mycobacterium tuberculosis* en España. *Rev Esp Quimioter* **2008;** 21: 22-25.

Jiménez-Fuentes MA, Rodrigo T, Altet N, Jiménez-Ruiz CA, Casals M, Penas A, Mir I, Solano Reina S, Riesco-Miranda JA, Caylá JA, smoking and tuberculosis research working group. Factors associated with smoking among tuberculosis patients in Spain. *BMC Infect Dis* **2016;** 16:486. DOI: 10.1186/s12879-016-1819-1. DOI: 10.1186/s12879-016-1819-1.

Jindani A. Short-course (6-month) treatment of pulmonary tuberculosis (Second East African/British Medical Research Council Study). *Bull Int Union Tuberc.* **1976.** 51:53-56.

Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* **1997.** 35:907-914. DOI: 10.1128/JCM.35.4.907-914.1997.

Kendall EA, Schumacher SG, Denkinger CM, Dowdy DW. Estimated clinical impact of the Xpert MTB/RIF Ultra cartridge for diagnosis of pulmonary tuberculosis: a modelling study. *PLoS Med.* **2017.** 14:e1002472. DOI: 10.1371/journal.pmed.1002472.

BIBLIOGRAFIA

Koziel H, Koziel MJ. Pulmonary complications of diabetes mellitus. *Infect Dis Clin North Am.* **1995.** 9:65-96.

Kubica GP, Dye WE, Cohn ML, Middlebrook G. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis.* **1963;** 87:775-779. DOI: 10.1164/arrd.1963.87.5.775.

Kushner S, Dalalian H, Sanjurjo JL, Bach Jr FL, Safir SR, Smith Jr VK, Williams JH. Experimental chemotherapy of tuberculosis. II. The synthesis of pyrazinamides and related compounds. *J Am Chem Soc.* **1952.** 14:3617-3621.

Lee H, Cho S, Bang H, Lee J, Bai G, Kim S, Kim J. Exclusive mutations related to isoniazid and ethionamide resistance among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea. *Int J Tuberc Lung Dis.* **2000.** 4:441-447.

Lew W, Pai M, Oxalde O, Martín D, Menzies D. Initial drug resistance and tuberculosis treatment outcomes: Systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med.* **2008.** 149:123-134. DOI: 10.7326/0003-4819-149-2-200807150-00008.

Li J, Gao X, Luo T, Wu J, Sun G, Liu Q, Jiang Y, Zhang Y, Mei J, Gao Q. Association of *gyrA/B* mutations and resistance levels to fluoroquinolones in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Microbes Infect.* **2014.** 3:e19. DOI: 10.1038/emi.2014.21.

Lin C, Russell C, Soll B, Chow D, Bamrah S, Brostrom R, Kim W, Scott J, Bankowski MJ. Increasing prevalence of nontuberculous mycobacteria in respiratory specimens from US-affiliated Pacific Islands jurisdictions. *Emerg Infect Dis.* **2018.** 24:485–91. DOI: 10.3201/eid2403.171301.

Liu Q, Zhu L, Shao Y, Song H, Li G, Zhou Y, Shi J, Zhong C, Chen C, Lu W. Rates and risk factors for drug resistance tuberculosis in Northeastern China. *BMC Public Health.* **2013.** 13:1171. DOI: 10.1186/1471-2458-13-1171.

Lusiba JK, Nakiyingi L, Kirenga BJ, Kiragga A, Lukande R, Nsereko M, Ssenooba W, Katamba A, Worodria W, Joloba ML, Mayanja-Kizza H. Evaluation of Cepheid's Xpert MTB/RIF test on pleural fluid in the diagnosis of pleural tuberculosis in a high prevalence HIV/TB setting. *PLoS One.* **2014.** 9:e102702. DOI: 10.1371/journal.pone.0102702.

Lyon SM, Rossman MD. Pulmonary tuberculosis. *Microbiol Spectr.* **2017.** 5. DOI: 10.1128/microbiolspec.TNMI7-0032-2016.

Macallan DC. Malnutrition in tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **1999.** 34:153-157. DOI: 10.1016/s0732-8893(99)00007-3.

Marais BJ. Tuberculosis in children. *J Paediatr Child Health.* **2014.** 50:759-767. DOI: 10.1111/jpc.12503.

Martín C, Aguilo N, Gonzalo-Asensio J. Vaccination against tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **2018.** 36:648-656. DOI: 10.1016/j.eimc.2018.02.006.

Martin-Casabona N, Alcaide F, Coll P, González J, Manterota JM, Salvadó M, Caylà JA. Farmacorresistencia de *Mycobacterium tuberculosis*. Estudio multicéntrico en el área de Barcelona. *Med Clin (Barc)* **2000;** 115: 493-498. DOI: 10.1016/S0025-7753(00)71603-4.

Martínez González S, Cano Cortés A, Sota Yoldi LA, García García JM, Alba Álvarez LM, Palacios Guriérrez JJ. Non-tuberculous mycobacteria. An emerging threat?. *Arch Bronconeumol.* **2017.** 53:554-560. DOI: 10.1016/j.arbres.2017.02.014.

Maruri F, Sterling TR, Kaiga AW, Blackman A, van der Heijden YF, Mayer C, Cambau E, Aubry A. A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system. *J Antimicrob Chemother.* **2012.** 67:819-31. DOI: 10.1093/jac/dkr566.

Maus CE, Plikaytis BB, Shinnick TM. Molecular analysis of cross-resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in *Mycobacterium tuberculosis*.

BIBLIOGRAFIA

Antimicrob Agents Chemother. **2005**. 49:3192-3197. DOI: 10.1128/AAC.49.8.3192-3197.2005.

McDermott W, Tompsett R. Activation of pyrazinamide and nicotamide in acidic environments in vitro. Am Rev Tuberc. **1954**. 70:748-754. DOI: 10.1164/art.1954.70.4.748.

Migliori GB, Eker B, Richardson MD, Sotgiu G, Zellweger JP, Skrahina A, Ortmann J, Girardi E, Hoffmann H, Besozzi G, Bevilacqua N, Kirsten D, Centis R, Lange C. A retrospective TBNET assessment of linezolid safety, tolerability and efficacy in multidrug-resistant tuberculosis. Eur Respir J. **2009**. 34:387-393. DOI: 10.1183/09031036.00009509.

Ministerio de Trabajo, Migraciones y Seguridad Social. Secretaría de Estado de Migraciones. Secretaria General de inmigración y emigración. Extranjeros con certificado de registro o tarjeta de residencia en vigor. 31 de diciembre de 2018. Resultados detallados. Total Nacional. **2019**.

Mir Viladrich I, Daudén Tello E, Solano-López G, López Longo FJ, Taxonera Samsó C, Sánchez Martínez P, Martínez Lacasa X, García Gasalla M, Dorca Sargatal J, Arias-Guillén M, García García JM. Consensus Document on Prevention and Treatment of Tuberculosis in Patients for Biological Treatment. Arch Bronconeumol. **2016**. 52:36-45. DOI: 10.1016/j.arbres.2015.04.016.

Mitchell G, Chen C, Portnoy DA. Strategies used by bacteria to grow in macrophages. Microbiol Spectr. **2016**. 4. DOI: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0012-2015.

Molina-Moya B, Lacoma A, Prat C, Pimkina E, Diaz J, García-Sierra N, Haba L, Maldonado J, Samper S, Ruiz-Manzano J, Ausina V, Dominguez J. Diagnostic accuracy study of multiplex PCR for detecting tuberculosis drug resistance. J Infect. **2015**. 71:220-30. DOI: 10.1016/j.jinf.2015.03.011.

Morales-García C, Rodrigo T, García-Clemente MM, Muñoz A, Bermúdez P, Casas F, Somoza M, Milá C, Penas A, Hidalgo C, Casals M, Caylá JA, Working Group on Under-

reporting of Tuberculosis in Spain. Factors associated with unreported tuberculosis cases in Spanish hospitals. *BMC Infect Dis* **2015**. 15:295. DOI: 10.1186/s12879-015-1047-0.

Moreno-Molina M, Comas I, Furió V. The future of TB resistance diagnosis: the essentials on Whole Genome Sequencing and rapid testing methods. *Arch Bronconeumol*. **2019**. 8:421-426. DOI: 10.1016/j.arbres.2019.01.002.

Moure R, Español M, Tudó G, Vicente E, Coll P, González-Martin J, Mick V, Salvadó M, Alcaide F. Characterization of the *embB* gene in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Barcelona and rapid detection of main mutations related to ethambutol resistance using a low-density DNA array. *J Antimicrob Chemother*. **2014**. 69:947-954. DOI: 10.1093/jac/dkt448.

Moure R, Martín R, Alcaide F. Effectiveness of an integrated real-time PCR method for detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in smear-negative extrapulmonary samples in an area of low tuberculosis prevalence. *J Clin Microbiol*. **2012**. 50:513-515. DOI: 10.1128/JCM.06467-11.

Moure R, Martín R, Alcaide F. Silent mutation in *rpoB* detected from clinical samples with rifampin-susceptible *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. **2011**. Letter. DOI: 10.1128/JCM.05314-11.

Moure R, Muñoz L, Torres M, Santin 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. *J Clin Microbiol*. **2011**. 49:1137-1139. DOI: 10.1128/JCM.01831-10.

Moure R, Tудо G, Medina R, Vicente E, Caldito JM, Codina MG, Coll P, Español M, Gonzalez-Martin J, Rey-Jurado E, Salvado M, Tórtola MT, Alcaide F. Detection of streptomycin and quinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by a low-density DNA array. *Tuberculosis (Edinb)*. **2013**. 93:508-514 DOI: 10.1016/j.tube.2013-07.001.

BIBLIOGRAFIA

Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev.* **1995.** 8:496-514.

Neyrolles O, Hernández-Pando R, Pietri-Rouxel F, Fornès P, Tailleux L, Barrios Payán JA, Pivert E, Bordat Y, Aguilar D, Prévost MC, Petit C, Gicquel B. Is adipose tissue a place for *Mycobacterium tuberculosis* persistence?. *PLoS One.* **2006.** 1:e43. DOI: 10.1371/journal.pone.0000043.

Nicol MP, Workman L, Isaacs W, Munro J, Black F, Eley B, Boehme CC, Zemanay W, Zar HJ. Accuracy of the Xpert MTB/RIF test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children admitted to hospital in Cape Town, South Africa: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.* **2011.** 11:819-824. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70167-0.

Nicol MP, Workman L, Prins M, Bateman L, Ghebrekristos Y, Mbhele S, Denkinger CM, Zar HJ. Accuracy of Xpert MTB/RIF Ultra for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children. *Pediatr Infect Dis J.* **2018.** 37:e261-e263. DOI: 10.1097/INF.0000000000001960.

Nikolayevskyy V, Kranzer K, Niemann S, Drobniowski F. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of recent transmission and tracing outbreaks: A systematic review. *Tuberculosis (Edinb).* **2016.** 98:77-85. DOI: 10.1016/j.tube.2016.02.009.

Penz E, Boffa J, Roberts DJ, Fisher D, Cooper R, Ronksley PE, James MT. Diagnostic accuracy of the Xpert MTB/RIF assay for extrapulmonary tuberculosis: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis.* **2015.** 19:278-284. DOI: 10.5588/ijtld.14.0262.

Perdigão J, Gomes P, Miranda A, Maltez F, Machado D, Silva C, Phelan JE, Brum L, Campino S, Couto I, Viveiros M, Clark TG, Portugal I. Using genomics to understand the origin and dispersion of multidrug and extensively drug resistant tuberculosis in Portugal. *Sci Rep.* **2020.** 10:2600. DOI: 10.1038/s41598-020-59558-3.

Pérez Del Molino ML, Barbeito-Castiñeiras G, Mejuto B, Alonso P, Fernández A, González-Mediero G; Galician M. tuberculosis Resistance Group. The genotypic

study of *Mycobacterium tuberculosis* complex resistant to isoniazid: Galicia, Spain (2008-2013). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **2016** Nov;35(11):1795-1801. DOI: 10.1007/s10096-016-2730-9. DOI: 10.1007/s10096-016-2730-9.

Pérez Del Molino Bernal ML, Túñez V, Cruz-Ferro E, Fernández-Villar A, Vázquez-Gallardo R, Díaz-Cabanela D, Anibarro L, Grupo Galego de Estudio de Resistencias de *M. tuberculosis*. Study of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in the region of Galicia, Spain. *Int J Tuberc Lung Dis*. **2005**; 9: 1230-1235.

Pérez-García F, Ruiz-Serrano MJ, López Roa P, Acosta F, Pérez-Lago L, García-De-Viedma D, Bouza E. Diagnostic performance of Anyplex II MTB/MDR/XDR for detection of resistance to first and second line drugs in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods*. **2017**. 139:74-78. DOI: 10.1016/j.mimet.2017.05.006.

Perez-Risco D, Rodriguez-Temporal D, Valledor-Sanchez I, Alcaide F. Evaluation of the Xpert MTB/RIF Ultra assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in smear-negative Extrapulmonary Samples. *J Clin Microbiol*. **2018**. 56. DOI: 10.1128/JCM.00659-18.

Perry MD, Lewis White P, Ruddy M. Potential for use of the Seegene Anyplex MTB/NTM Real-Time detection assay in a regional reference laboratory. *J Clin Microbiol*. **2014**. 52: 1708-1710. DOI: 10.1128/JCM.03585-13.

Pfyffer GE. *Mycobacterium*: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. Jorgensen JH, Pfaller MA. *Manual of clinical microbiology*. 11th Edition. Washington: ASM Press, **2015**, Volume 1, Chapter 30, p 536-569.

Pi R, Liu Q, Jiang Q, Gao Q. Characterization of linezolid-resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis* through WGS. *J Antimicrob Chemother*. **2019**. 74:1795-1798. DOI: 10.1093/jac/dkz150.

Pienaar E, Linderman JJ, Kirschner DE. Emergence and selection of isoniazid and rifampin resistance in tuberculosis granulomas. *PLoS One*. **2018**. 13:e0196322. DOI: 10.1371/journal.pone.0196322.

Pignone M, Greth KM, Cooper J, Emerson D, Tang J. Identification of mycobacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **2006.** 44:1963-1970. DOI: 10.1128/JCM.01959-05.

Puri L, Oghor C, Denkinger CM, Pai M. Xpert MT/RIF for tuberculosis testing: access and price in highly privatized health markets. *Lancet Glob Health.* **2016.** 4:94-95. DOI: 10.1016/S2214-109X(15)00269-7.

Pym AS, Diacon AH, Tang SJ, Conradie F, Danilovits M, Chuchottaworn C, Vasilyeva I, Andries K, Bakare N, De Marez T, Haxaire-Theeuwes M, Lounis N, Meyvisch P, Van Baelen B, van Heeswijk RPG, Dannemann B, TMC207-C209 Study Group. Bedaquiline in the treatment of multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis. *Eur Respir J.* **2016.** 47:564-574. DOI: 10.1183/13993003.00724-2015.

Remacha Esteras MA, Parra Parra I, Esteban Martín A, Blanco Mercadé MD. *Mycobacterium tuberculosis* resistance in a hospital in Leon. *Rev Esp Quimioterap.* **2003.** 16:455-456.

Roberts GD, Goodman NL, Heifets L, Larsh HW, Lindner TH, McClatchy JK, McGinnis MR, Siddiqi SH, Wright P. Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens. *J Clin Microbiol.* **1983.** 18:689-696.

Rodrigo T, Casals M, Caminero JA, García-García JM, Jiménez-Fuentes MA, Medina JF, Millet JP, Ruiz-Manzano J, Caylá J, Working Group of the Integrated Programme of Tuberculosis Research. Factors Associated with Fatality during the Intensive Phase of Anti-Tuberculosis Treatment. *PLoS One.* **2016.** 11. DOI: 10.1371/journal.pone.0159925.

Ruiz M, Torres MJ, Llanos AC, Arroyo A, Palomares JC, Aznar J. Direct detection of rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in auramine-rhodamine-positive sputum specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* **2004.** 42:1585-1589. DOI: 10.1128/JCM.42.4.1585-1589.2004.

Runyon EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin North Am.* **1959.** 43:273-290. DOI: 10.1016/s0025-7125(16)34193-1.

Sánchez-Montalvá A, Salvador F, Molina-Morant D, Molina I. Tuberculosis e inmigración. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **2017.** 36:446-455. DOI: 10.1016/j.eimc.2017.10.006.

Santin M, Barrabeig I, Malchair P, Gonzalez-Luquero L, Benitez MA, Sabria J, Palau-Benavent M, Cañete C, Lloret-Queraltó JA, Grijota-Camino MD, Dorca J, Alcaide F. Pulmonary Infections with Nontuberculous Mycobacteria, Catalonia, Spain, 1994-2014. *Emerg Infect Dis.* **2018.** 24:1091-1094. DOI: 10.3201/eid2406.172095.

Sanz Barbero B, Blasco Hernández T y colaboradores del proyecto ATBIM. Situación actual de las resistencias de *Mycobacterium tuberculosis* en la población inmigrante de la Comunidad de Madrid. *Arch Bronconeumol.* **2007.** 43: 324-33. DOI: 10.1157/13106563.

Sanz-Peláez O, Caminero-Luna JA, Pérez-Arellano JL. Tuberculosis and immigration in Spain. Evidences and controversies. *Med Clin (Barc).* **2006.** 126:259-269. DOI: 10.1157/13085289.

Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med.* **1996.** 2:662-667.

Schaaf HS, Victor TC, Venter A, Brittle W, Jordaan AM, Hesseling AC, Marais BJ, van Helden PD, Donald PR. Ethionamide cross-and co-resistance in children with isoniazid-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* **2009.** 13:1355-1359.

Schön T, Werngren J, Machado D, Borroni E, Wijkander M, Lina G, Mouton J, Matuschek E, Kahlmeter G, Giske C, Santin M, Cirillo DM, Viveiros M, Cambau E. Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates – the EUCAST broth microdilution reference method for MIC determination. *Clin Microbiol Infect.* **2020.** 26:1488-1492. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.07.036.

BIBLIOGRAFIA

Seegene. Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (v2.0): Instruction manual. **2014.** Seegene, Inc., Seoul, South Korea.

Seegene. Anyplex™ II MTB/MDR/XDR Detection: Instruction manual. **2018.** Seegene, Inc., Seoul, South Korea.

Shaw JA, Irusen EM, Diacon AH, Koegelenberg CF. Pleural tuberculosis: a concise clinical review. *Clin Respir J.* **2018.** 12:1779-1786. DOI: 10.1111/crj.12900.

Sirgel FA, Tait M, Warren RM, Streicher EM, Bottger EC, Helden PV, Gey C, van Pittius NC, Coetzee G, Hoosain EY, Chabula-Nxiweni Mamisa, Hayes Cindy, Victor Thomas C, Trollip André. Mutations in the *rrs* A1401G Gene and Phenotypic Resistance to Amikacin and Capreomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbial Drug Resistance.* **2012.** 18. DOI: 10.1089/mdr.2011.0063.

Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res.* **2001.** 2:164-168. DOI: 10.1186/rr54.

Sonkin LS. The role of particle size in experimental air-borne infection. *Am J Hyg.* **1951.** 53:337-354. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a119459.

Stead WW. Variation in vulnerability to tuberculosis in America today: random, or legacies of different ancestral epidemics?. *Int J Tuberc Lung Dis.* **2001.** 5:807-814.

Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 1:CD009593. **2014.** DOI: 10.1002/14651858.CD009593.pub3.

Story A, Muraad S, Roberts W, Verheyen M, Hayward AC, London Tuberculosis Nurses Network. Tuberculosis in London: the importance of homelessness, problem drug use and prison. *Thorax.* **2007.** 62:667-671. DOI: 10.1136/thx.2006.065409.

Sugawara I, Zhang J, Li C. Cross-resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates among streptomycin, kanamycin and amikacin. *Indian J Exp Biol.* **2009.** 47:520-522.

Supply P, Magdalena J, Himpens S, Loch C. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Mol Microbiol.* **1997.** 26:991-1003. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1997.6361999.x.

Suzuki Y, Katsukawa C, Tamaru A, Abe C, Makino M, Mizuguchi Y, Taniguchi H. Detection of kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol.* **1998.** 36:1220-1225. DOI: 10.1128/JCM.36.5.1220-1225.1998.

Szumowski JD, Lynch JB. Profile of delamanid for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Drug Des Devel Ther.* **2015.** 9:677-682. DOI: 10.2147/DDDT.S60923.

Tajbakhsh A, Ghasemi F, Zohre Mirbagheri S, Momen Heravi M, Rezaee M, Meshkat Z. Investigation of the *rpoB* mutations causing rifampin resistance by rapid screening in *Mycobacterium tuberculosis* in North-east of Iran. *Iran J Pathol.* **2018.** 13:429-437.

Takiff HE, Salazar L, Guerrero C, Philipp W, Huang WM, Kreiswirth B, Cole ST, Jacobs Jr WR, Telenti A. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* **1994.** 38:773-780. DOI: 10.1128/aac.38.4.773.

Tameris MD, Hatherill M, Landry BS, Scriba TJ, Snowden MA, Lockhart S, Shea JE, McClain JB, Hussey GD, Hanekom WA, Mahomed H, McShane H, MVA85A 020 Trial Study Team. Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with VCG: a randomized, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet.* **2013.** 381:1021-1028. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60177-4.

Tarrand JT, Groschel DHM. Evaluation of the BACTEC radiometric method for detection of 1% resistant populations of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* **1985.** 6:941-946.

Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K, Bodmer T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet.* **1993.** 341:647-650. DOI: 10.1016/0140-6736(93)90417-f.

BIBLIOGRAFIA

Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Schmidheini T, Bodmer T. Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrob Agents Chemother.* **1993.** 37:2054-2058.

Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* **1993.** 31:175-178.

Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, Bernasconi C, Stockbauer KE, Wieles B, Musse JM, Jacobs Jr WR. The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat Med.* **1997.** 3:567-570. DOI: 10.1038/nm0597-567.

Theron G, Peter J, Richardson M, Warren R, Dheda K, Steingart KR. GenoType MTBDRs/ assay for resistance to second-line anti-tuberculosis drugs. *Cochrane Database Syst Rev.* **2016.** 2016:CD010705. DOI: 10.1002/14651858.CD010705.pub3.

Theron G, Venter R, Smith L, Esmail A, Randall P, Sood V, Oelfese S, Calligaro G, Warren R, Dheda K. False-positive Xpert MTB/RIF results retested patients with previous tuberculosis: frequency, profile, and prospective clinical outcomes. *J Clin Microbiol.* **2018.** 565:e01696-17. DOI: [10.1128/JCM.01696-17](https://doi.org/10.1128/JCM.01696-17).

Thierry D, Brisson-Nöel A, Vincent-Lévy-Frébault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, *IS6110*, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol.* **1990.** 28:2688-2673.

Thomas JP, Baughn CO, Wilkinson RG, Sheperd RG. A new synthetic compound with antituberculous activity in mice: ethambutol (dextro-2,2'-(ethylenediimino)-di-l-butanol). *Am Rev Respir Dis.* **1961.** 83:891-893. DOI: 10.1164/arrd.1961.83.6.891.

Tirado Balaguer MD, Moreno Muñoz R, Marín Royo M, González Morán F, Pardo Serrano F, García del Busto Remón A, Prada Alfaro P. Impacto de la inmigración en las

resistencias de *Mycobacterium tuberculosis* en la provincia de Castellón: 1995-2003. Med Clin (Barc). **2006**; 126: 761-4. DOI: 10.1157/13089102.

Tortoli E, Marcelli F. Use of the INNO LiPA Rif.TB for detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA directly in clinical specimens and for simultaneous determination of rifampin susceptibility. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **2007**. 26:51-55. DOI: 10.1007/s10096-006-0240-x.

Tudó G, Rey E, Borrell S, Alcaide F, Codina G, Coll P, Martín-Casabona N, Montemayor M, Moure R, Orcau A, Salvadó M, Vicente E, González-Martín J. Characterization of mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the area of Barcelona. J Antimicrob Chemother. **2010**. 65:2341-2346. DOI: 10.1093/jac/dkq322.

Unidad de Vigilancia de VIH y Comportamiento de Riesgo. Vigilancia Epidemiológica del VIH y sida en España 2018: Sistema de información sobre nuevos diagnósticos de VIH y registro de casos de Sida. Plan Nacional sobre el Sida. Dirección General de Salud Pública, Calidad e Innovación. Centro Nacional de Epidemiología. ISCIII. Madrid. Nov **2019**.

Uzun M, Erturan Z, Ang O. Investigation of cross-resistance between rifampin and rifabutin in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. Int J Tuberc Lung Dis. **2002**. 6:164-165.

Vadwai V, Ajbani K, Jose M, Vineeth VP, Nikam C, Deshmukh M, Shetty A, Soman R, Rodrigues C. Can *inhA* mutation predict ethionamide resistance?. Int J tuberc Lung Dis. **2013**. 17:129-130. DOI: 10.5588/ijtld.12.0511.

Vadwai V, Boehme C, Nabeta P, Shetty A, Alland D, Rodrigues C. Xpert MTB/RIF: a new pillar in diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. J Clin Microbiol. **2011**. 49:2540-2545. DOI: 10.1128/JCM.02319-10.

van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM, Small PM. Strain identification of *Mycobacterium*

BIBLIOGRAFIA

tuberculosis by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol. **1992**. 31: 406-409.

van Soolingen D, de Haas PE, van Doorn HR, Kuijper E, Rinder H, Borgdorff MW. Mutations at amino acid position 315 of the *katG* gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. J Infect Dis. **2000**. 182:1788-90. DOI: 10.1086/317598.

VersaTrek. VersaTREK Myco susceptibility kit, 7115-60. 2010. http://www.trekds.com/techDocsVT/techInsert/TI_VersaTREK_Myco_Susceptibility_Kit_L-TDST014-8.pdf.

VersaTrek. VersaTREK Myco PZA kit, 7116-70. 2010. http://www.trekds.com/techDocsVT/techInsert/TI_VersaTREK_Myco_PZA_Kit_L-TDST015-7.pdf.

VersaTrek. VersaTREK Myco Streptomycin kit, 7120-60. 2010. http://www.trekds.com/techDocsVT/techInsert/TI_VersaTREK_Myco_Streptomycin_L-TDST020-5.pdf.

Vicente D, Basterretxea M, de la Caba I, Sancho R, López-Olaizola M, Cilla G. Low antimicrobial resistance rates of *Mycobacterium tuberculosis* complex between 2000 and 2015 in Gipuzkoa, northern Spain. Enferm Infecc Microbiol Clin. **2019** Mar 5. pii: S0213-005X(19)30133-8. DOI: 10.1016/j.eimc.2019.01.016.

Vilaplana C, Cardona PJ. How far are we away from an improved vaccine for tuberculosis? Current efforts and future prospects. Arch Bronconeumol. **2018**. 55:373-377. DOI: 10.1016/j.arbr.2018.11.020.

Vilchèze C, Jacobs Jr WR. Resistance to Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: Genes, Mutations, and Causalities. Microbiol Spectr. **2014**. 2:MGM2-0014-2013. DOI: 10.1128/microbiolspec.MGM2-0014-2013.

Villellas C, Aristimuño L, Vitoria MA, Prat C, Blanco S, de Viedma DG, Domínguez J, Samper S, Aínsa JA. Analysis of mutations in Streptomycin-resistant strains reveals a simple and reliable genetic marker for identification of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Genotype. *J Clin Microbiol.* **2013.** 51:2124-2130. DOI: 10.1128/JCM.01944-12.

Viñuelas-Bayón J, Vitoria MA, Samper S. Rapid diagnosis of tuberculosis. Detection of drug resistance mechanisms. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **2017.** 35:520-528. DOI: 10.1016/j.eimc.2017.01.015.

Vorster MJ, Allwood BW, Diacon AH, Koegelenberg CF. Tuberculous pleural effusions: advances and controversies. *J Thorac Dis.* **2015.** 7:981-991. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2015.02.18.

Wall S, Ghanekar K, McFadden J, Dale JW. Context-sensitive transposition of IS6110 in mycobacteria. *Microbiology.* **1999.** 145:3169-3176. DOI: 10.1099/00221287-145-11-3169.

Walzl G, McNerney R, du Plessis N, Bates M, McHugh TD, Chegou NN, Zumla A. Tuberculosis: advances and challenges in development of new diagnostics and biomarkers. *Lancet Infect Dis* **2018.** 18:199-210. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30111-7.

Workicho A, Kassahun Wondwosen F A. Risk factors for multidrug-resistant tuberculosis among tuberculosis patients: a case-control study. *Infect Drug Resist.* **2017.** 10:91-96. DOI: 10.2147/IDR.S126274.

World Health Organization. 10 facts on tuberculosis. **2018.** World Health Organization, Geneva, Switzerland.

World Health Organization. Automated real-time nucleic acid amplification Technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children: policy Update. WHO/HTM/TB/2013.16. **2013.** World Health Organization, Geneva, Switzerland.

BIBLIOGRAFIA

World Health Organization. Fact sheet on tuberculosis and tobacco. **2009.** World Health Organization, Geneva, Switzerland.

World Health Organization. Global Leprosy update. **2019.** World Health Organization, Geneva, Switzerland.

World Health Organization. Global Tuberculosis Report. **2020.** World Health Organization, Geneva, Switzerland.

World Health Organization. Global Tuberculosis Report. **2019.** World Health Organization, Geneva, Switzerland.

World Health Organization. Global Tuberculosis Report. **2015.** World Health Organization, Geneva, Switzerland.

World Health Organization. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis 2011 update. **2011.** World Health Organization, Geneva, Switzerland.

World Health Organization. Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care. 2017 update. **2017.** World Health Organization, Geneva, Switzerland.

World Health Organization. Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). Policy statement. **2008.** World Health Organization, Geneva, Switzerland.

World Health Organization. Technical report on critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis **2018.** World Health Organization, Geneva, Switzerland.

World Health Organization. Rapid implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test. **2011.** World Health Organization, Geneva, Switzerland.

World Health Organization. The use of molecular line probe assay for the detection of resistance to isoniazid and rifampicin. Policy update. **2016.** World Health Organization, Geneva, Switzerland.

World Health Organization. Tuberculosis & Diabetes. **2016.** World Health Organization, Geneva, Switzerland.

World Health Organization. Tuberculosis country profiles. Spain 2018. **2019.** World Health Organization, Geneva, Switzerland.

World Health Organization. WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis. **2016.** World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Xia H, Zheng Y, Zhao B, van den Hof S, Cobelens F, Zhao Y. Assessment of a 96-well plate assay of quantitative drug susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis* complex in China. PLoS One. **2017.** 12:e0169413. DOI: 10.1371/journal.pone.0169413.

Xu HB, Jiang RH, Sha W, Li L, Xiao HP. PCR-single-strand conformational polymorphism method for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: systematic review and meta-analysis. J Clin Microbiol. **2010.** 48:3635-3640. DOI: 10.1128/JCM.00960-10.

Yamaguchi R, Matsuo K, Yamazaki A, Abe C, Nagai S, Terasaka K, Yamada T. Cloning and characterization of the gene for immunogenic protein MPB64 of *Mycobacterium bovis* BCG. Infect Immun. **1989.** 57:283-288.

Yeager H Jr, Lacy J, Smith LR, LeMaistre CA. Quantitative studies of mycobacterial populations in sputum and saliva. Am Rev Respir Dis. **1967.** 95:998-1004. DOI: 10.1164/arrd.1967.95.6.998.

Youmans GP, Williston EH, Feldman WH, Hinshaw HC. Increase in resistance of tubercle bacilli to streptomycin; a preliminary report. Proc Staff Meet Mayo Clin. **1946.** 21:126-127.

BIBLIOGRAFIA

Zar HJ, Workman L, Nicol MP. Diagnosis of pulmonary tuberculosis in HIV-infected and uninfected children using Xpert MTB/RIF Ultra, abstr A7610. **2017.** ATS 2017 International Conference. American Thoracic Society, Washington, DC. DOI: abs/10.1164/ajrccm-conference.2017.195.1_MeetingAbstracts.A7610.

Zaubrecher MA, Sikes RD Jr, Metchock B, Shinninck TM, Posey JE. Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase eis confers kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A. **2009.** 106:20004-20009. DOI: 10.1073/pnas.0907925106.

Zhan L, Wang J, Wang L, Qin C. The correlation of drug resistance and virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. Biosafety and Health. **2020.** 18-24. DOI: 10.1016/j.bsheal.2020.02.004.

Zhang M, Xue M, He JQ. Diagnostic accuracy of the new Xpert MTB/RIF Ultra for tuberculosis disease: a preliminary systematic review and meta-analysis. Int J Infect Dis. **2020.** 90:35-45. DOI: 10.1016/j.ijid.2019.09.016.

Zhang S, Chen J, Cui P, Shi W, Zhang W, Zhang Y. Identification of novel mutations associated with clofazimine resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother. **2015.** 70:2507-2510. DOI: 10.1093/jac/dkv150.

Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015. Int J Tuberc Lung Dis. **2015.** 19:1276-1289. DOI: 10.5588/ijtld.15.0389.

Zierski M. Capreomycin and other drugs in the treatment of pulmonary tuberculosis. Tubercle. **1969.** 50:37-39.

Zimenkov DV, Nosova EY, Kulagina EV, Antonova OV, Arslanbaeva LR, Isakova AI, Krylova LY, Peretokina IV, Makarova MV, Safonova SG, Borisov SE, Gryadunov DA. Examination of bedaquiline- and linezolid-resistant *Mycoabcterium tuberculosis* isolates from the Moscow region. J Antimicrob Chemother. **2017.** 72:1901-1906. DOI: 10.1093/jac/dkx094.

Zumla A, Nahid P, Cole ST. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nat Rev Drug Discov.* **2013.** 12:388-404. DOI: 10.1038/nrd4001.

Zúñiga J, Torres-García D, Santos-Mendoza T, Rodriguez-Reyna TS, Granados J, Yunis EJ. Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. *Clin Dev Immunol.* **2012.** 2012:193923. DOI: 10.1155/2012/193923.

ANEXO

Estudio de las resistencias a los fármacos y los mecanismos moleculares más frecuentes en *Mycobacterium tuberculosis* en España (Estudio REMOTUBES)
Proyecto PII-TB SEPAR

Investigador Principal:

A continuación le explicamos en qué consiste el estudio, su objetivo y su papel como participante. Lea atentamente esta información y no dude en solicitar cualquier tipo de aclaración que considere oportuna. El investigador responderá a cualquier pregunta que usted le formule.

La tuberculosis sigue siendo una enfermedad frecuente en España. Es una infección producida por una bacteria (el bacilo de Koch) que se transmite por vía respiratoria al toser, estornudar o hablar, de personas enfermas a los que les rodean.

Es importante saber que la enfermedad cura bien con el tratamiento adecuado que es largo y debe cumplirse rigurosamente.

¿Cómo se diagnostica la tuberculosis?

Cuando una persona tiene síntomas que hacen sospechar que padece tuberculosis, se realiza un examen clínico, una radiografía y unas pruebas para encontrar el bacilo de Koch. El demostrar la presencia del bacilo de Koch establece el diagnóstico de tuberculosis con toda seguridad.

¿Cómo se trata la tuberculosis?

Una vez que se le ha diagnosticado de padecer tuberculosis se deberá iniciar un tratamiento con varios medicamentos a la vez que tendrá que tomar todos los días y durante un periodo de tiempo largo (6 meses).

El posible problema, es que existen algunos casos de tuberculosis en que los bacilos son resistentes a uno o varios de los medicamentos que se utilizan normalmente. Para ello se hace pruebas en el laboratorio con los cultivos crecidos y que requieren varias semanas para obtener los resultados y saber si la tuberculosis es resistente o no. Ello es muy importante ya que, si fuera resistente, habría que cambiar el tratamiento con otros medicamentos alternativos.

¿Cuál es el objetivo del estudio?

En nuestro país no conocemos muy bien la frecuencia de la tuberculosis resistente a los medicamentos. El objetivo de este estudio, y para el cual le pedimos su participación, es analizar los bacilos de Koch en el laboratorio para saber si son

resistentes a los medicamentos y a cuales. De paso, en el laboratorio se les estudiará mas a fondo para saber porque son resistentes y poder aplicar en un futuro próximo (tras el estudio) técnicas de laboratorio moleculares para poder detectar esta resistencia a los medicamentos más rápido y así dar el tratamiento más adecuado y correcto y eficaz posible. En este estudio participaran cientos de personas que se encuentran en su misma situación, y que se estudian en varios hospitales de España.

¿En qué consistirá mi participación?

Su participación en el estudio consistirá únicamente en poder utilizar sus datos clínicos, radiológicos y de las pruebas de laboratorio. Solicitamos por tanto su consentimiento para ello. Usted puede revocar su consentimiento durante el estudio dirigiéndose al médico investigador, y solicitar la anonimización de sus aislamientos de microorganismos (no podrá conocerse a quién pertenece las cepas). En todo caso, esta decisión no afectará a los resultados que se hayan obtenido ya previamente a la revocación.

¿Cuáles son los riesgos y beneficios del estudio?

No existe riesgo alguno para su salud, ya que no se hará nada fuera de lo que es habitual en la asistencia sanitaria a las personas enfermas en su misma situación.

En cuanto a los beneficios, no cabe esperar un beneficio directo para los participantes del estudio. El beneficio global, tal vez, se podría lograr al tener los resultados finales del estudio que permitan conocer la situación en nuestro país y así poder aplicar el mejor tratamiento y poder detectar lo antes posible las resistencias que pudieran existir.

Confidencialidad

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y solo su médico del estudio/colaboradores podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal. Las cepas de bacilo de Koch que se han aislado y se han utilizado para la investigación se codificarán con un código interno, por lo que no incluirán datos personales identificativos.

Sólo se transmitirán a terceros los datos recogidos para el estudio, que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, dirección, número de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

Tratamiento de los aislamientos clínicos del bacilo de Koch

Los microorganismos del bacilo de Koch (*Mycobacterium tuberculosis*) aislados en sus muestras clínicas serán tratados en todo momento según lo establecido por la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica. Las muestras se analizarán en el Servicio de Microbiología del propio centro. En caso de que se quisieran utilizar para otros fines, se le solicitará un consentimiento informado y la autorización del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC).

Es importante que antes de tomar una decisión sobre su participación tenga en cuenta las siguientes consideraciones:

- 1º. Su participación es absolutamente voluntaria. La no participación en el estudio no supondrá ningún menoscabo para la asistencia médica que se le vaya a ofrecer.
- 2º. En este estudio no se investiga ningún fármaco ni tratamiento nuevo o especial para su enfermedad.
- 3º. Los procedimientos y análisis que se le van a practicar no representan peligro alguno para su salud.
- 4º. En caso de participar tendrá derecho a conocer los resultados de las pruebas que se le realicen.

El máximo responsable del estudio es el **Dr. Fernando Alcaide** (Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Bellvitge). Estará a su disposición para cualquier duda o aclaración que usted quiera plantearle acerca de su participación en el estudio.

Si acepta participar, por favor, firme la hoja de consentimiento adjunta.

Título del estudio: **“Estudio de las resistencias a los fármacos y los mecanismos moleculares más frecuentes en *Mycobacterium tuberculosis* en España (Estudio REMOTUBES)”**

Yo, (Nombre y apellidos) _____

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y que mis datos clínicos puedan ser utilizados con fines de investigación.

Firma del investigador

Fecha (dd/mm/aa): __/__/__

DNI: _____

(persona que obtiene el consentimiento)

Firma del participante

Fecha (dd/mm/aa): __/__/__

DNI: _____