

PROGRAMA OFICIAL DE DOCTORADO EN MEDICINA CLÍNICA Y
SALUD PÚBLICA
UNIVERSIDAD DE GRANADA



TESIS DOCTORAL

**APLICACIÓN DE LA TÉCNICA SPEED OLIGO® AL
ESTUDIO DE LA TUBERCULOSIS**

Ana Lara Oya
Septiembre, 2015
Granada

Editorial: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: Ana Lara Oya

ISBN: 978-84-9125-295-5

URI: <http://hdl.handle.net/10481/41011>

La doctoranda **Ana Lara Oya** y los directores de la tesis **Dr. Javier Rodríguez Granger, Dr. José Gutiérrez Fernández y Dr. Pablo Mendoza López**, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

En Granada, septiembre de 2015

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.:

Fdo.:

El **Dr.Javier Rodríguez Granger**, F.E.A de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, el **Dr.José Gutiérrez Fernández**, Catedrático de Microbiología en la Universidad de Granada y F.E.A de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada y el **Dr.Pablo Mendoza López**, Director del Departamento de Biología Molecular en Vicell,

Certifican:

Que la tesis que presenta la Licenciada **Ana Lara Oya** “**Aportación de la técnica Speed Oligo® al estudio de la tuberculosis**” ha sido realizada bajo nuestra dirección, habiendo sido revisada y estando conformes con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal que designe la Universidad de Granada.

Granada, septiembre de 2015

Fdo: Javier Rodríguez Granger

Fdo: José Gutiérrez Fernández

Fdo: Pablo Mendoza López

▶ **ÍNDICE**

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 2 |
| 1.1 Generalidades | 3 |
| 1.1.1 Aspectos microbiológicos y taxonomía del género <i>Mycobacterium</i> | 3 |
| 1.1.1.1 Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 6 |
| 1.1.2 Genética de las micobacterias | 9 |
| 1.1.3 Patogenia de la infección..... | 14 |
| 1.1.4 Cuadros clínicos | 16 |
| 1.1.4.1 Tuberculosis respiratoria | 16 |
| 1.1.4.2 Tuberculosis extra-respiratoria | 17 |
| 1.1.5 Inmunología de la tuberculosis | 20 |
| 1.2 Epidemiología..... | 21 |
| 1.2.1 Antecedentes históricos..... | 21 |
| 1.2.2 Situación actual de la tuberculosis | 22 |
| 1.2.2.1 A nivel mundial | 23 |
| 1.2.2.2 En Europa..... | 25 |
| 1.2.2.3 En España..... | 26 |
| 1.2.3 Poblaciones de riesgo | 28 |
| 1.2.4 Epidemiología molecular | 29 |
| 1.2.5 Programas de control de la tuberculosis..... | 30 |
| 1.3 Diagnóstico microbiológico | 31 |
| 1.3.1 Diagnóstico de la infección tuberculosa..... | 31 |
| 1.3.1.1 Prueba de la tuberculina | 31 |
| 1.3.1.2 Interferón-Gamma Release Assays (IGRAs) | 31 |
| 1.3.2 Diagnóstico de la enfermedad tuberculosa..... | 32 |
| 1.3.2.1 Muestras: selección, recogida, transporte y conservación..... | 32 |
| 1.3.2.2 Pretratamiento de las muestras: descontaminación y concentración | 32 |
| 1.3.2.3 Baciloscopia..... | 33 |
| 1.3.2.4 Medios de cultivo..... | 34 |
| 1.3.2.5 Técnicas de identificación de micobacterias..... | 35 |
| 1.3.2.5.1 Identificación fenotípica..... | 35 |

Índice

| | | |
|-----------|--|----|
| 1.3.2.5.2 | Identificación cromatográfica | 36 |
| 1.3.2.5.3 | Identificación molecular..... | 36 |
| 1.3.2.5.4 | Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF).... | 37 |
| 1.3.2.6 | Técnicas de estudio de sensibilidad antibiótica | 38 |
| 1.4 | Tratamiento y prevención de la tuberculosis..... | 39 |
| 1.4.1 | Objetivos de la quimioterapia | 39 |
| 1.4.2 | Esquemas de tratamiento actuales..... | 39 |
| 1.4.3 | Tuberculosis resistente a drogas..... | 40 |
| 1.4.4 | Quimioprofilaxis | 42 |
| 1.4.5 | Vacuna BCG | 42 |
| 2. | JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS | 45 |
| 3. | MATERIALES Y MÉTODOS | 50 |
| 3.1 | Evaluación del Speed Oligo® Direct <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (SO-DMT) para la detección directa de micobacterias en muestras clínicas respiratorias | 51 |
| 3.2 | Diseño del Speed Oligo® <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex (SO-MTBC) para diferenciación de especies del complejo <i>M.tuberculosis</i> | 52 |
| 3.2.1 | Elección de regiones de delección (RD) y propuesta de algoritmos para la diferenciación del complejo <i>M.tuberculosis</i> con SO-MTBC..... | 52 |
| 3.2.2 | Diseño de cebadores para la amplificación de las RD seleccionadas en el SO-MTBC | 54 |
| 3.2.3 | Diseño de sondas para detectar los productos amplificados en el SO-MTBC | 56 |
| 3.2.4 | Montaje de las tiras de nitrocelulosa para la visualización de los resultados del SO-MTBC | 57 |
| 3.2.5 | Cepario de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex utilizado para el diseño del SO-MTBC | 57 |
| 3.2.6 | Extracción de ADN de las cepas utilizadas para el diseño del SO-MTBC... | 57 |
| 3.2.7 | Condiciones de PCR uniplex para cada una de las RD seleccionadas para el SO-MTBC | 58 |
| 3.2.8 | Electroforesis de los productos de amplificación de las RD seleccionadas para el SO-MTBC | 59 |

Índice

| | | |
|-----------|---|----|
| 3.2.9 | Condiciones de PCR multiplex del SO-MTBC..... | 59 |
| 3.2.10 | Procedimiento de la técnica SO-MTBC..... | 60 |
| 3.3 | Validación del SO-MTBC en comparación con GenoType® MTBC..... | 62 |
| 3.3.1 | Cepario de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex para la evaluación del SO-MTBC | 62 |
| 3.3.2 | Cepario de micobacterias no tuberculosas y otros géneros relacionados para la evaluación del SO-MTBC | 62 |
| 3.3.3 | Crecimiento de las cepas utilizadas para la validación del SO-MTBC..... | 63 |
| 3.3.4 | Extracción de ADN de las cepas utilizadas para la validación del SO-MTBC | 63 |
| 3.3.5 | Conservación de ADN de las cepas | 64 |
| 3.3.6 | Realización del SO- MTBC en cepas clínicas | 64 |
| 3.3.7 | Realización del GenoType® MTBC..... | 64 |
| 3.4 | Descripción de los casos de tuberculosis en el Área Norte de Granada..... | 66 |
| 3.4.1 | Variables sociodemográficas y clínicas incluidas en el estudio..... | 66 |
| 3.4.2 | Fuentes de información utilizadas para la recopilación de datos..... | 67 |
| 3.4.3 | Diagnóstico microbiológico..... | 67 |
| 3.4.3.1 | Tipos de muestras utilizadas para el diagnóstico microbiológico..... | 68 |
| 3.4.3.2 | Procesamiento de muestras | 69 |
| 3.4.3.3 | Microscopía | 69 |
| 3.4.3.4 | Cultivo | 69 |
| 3.4.3.4.1 | Medio sólido | 69 |
| 3.4.3.4.2 | Medio líquido..... | 70 |
| 3.4.3.5 | Antibiograma | 70 |
| 3.4.3.6 | Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos de muestra directa | 71 |
| 3.4.3.7 | Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos para la determinación de resistencias a isonizida y rifampicina | 71 |
| 3.4.4 | Conservación de cepas | 72 |
| 3.4.5 | Análisis estadístico..... | 72 |
| 4. | RESULTADOS..... | 74 |
| 4.1. | Evaluación del SO-DMT en muestras clínicas respiratorias..... | 75 |
| 4.2. | Diseño del SO-MTBC para la diferenciación de las especies del complejo <i>M.tuberculosis</i> | 77 |

Índice

| | | |
|----------|---|-----|
| 4.2.1. | Elección de RD para formar parte del algoritmo diagnóstico del SO-MTBC | 77 |
| 4.2.2. | Elección de cebadores para formar parte de la reacción de PCR multiplex del SO-MTBC | 79 |
| 4.2.2.1. | RD1 | 79 |
| 4.2.2.2. | RD4 | 81 |
| 4.2.2.3. | RD9 | 82 |
| 4.2.2.4. | RD12 | 84 |
| 4.2.2.5. | Región ITS | 86 |
| 4.2.3 | Sondas para detección de amplicones en SO-MTBC | 87 |
| 4.2.4 | Optimización de la PCR multiplex del SO-MTBC | 88 |
| 4.2.5 | Visualización de productos amplificados con la PCR multiplex: hibridación en tira | 91 |
| 4.3 | Validación del SO-MTBC | 92 |
| 4.3.1 | Estudio de las cepas seleccionadas con SO-MTBC | 92 |
| 4.3.2 | Comparación de resultados obtenidos en SO-MTBC con Genotype® MTBC | 93 |
| 4.4 | Estudio descriptivo de los casos de tuberculosis | 94 |
| 4.4.1 | Incidencia de tuberculosis | 94 |
| 4.4.2 | Características socio-demográficas de los pacientes: edad, sexo y nacionalidad | 95 |
| 4.4.3 | Características clínico-epidemiológicas de los pacientes con tuberculosis | 97 |
| 4.4.3.1 | Factores de riesgo y otras situaciones especiales | 99 |
| 4.4.3.2 | Estudios de contactos | 101 |
| 4.4.3.3 | Tratamiento | 101 |
| 4.4.4 | Estudio microbiológico de los pacientes diagnosticados de tuberculosis | 102 |
| 5. | DISCUSIÓN | 108 |
| 5.1 | Evaluación del SO-DMT para la detección directa de micobacterias en muestras clínicas respiratorias | 109 |
| 5.2 | Diseño y validación del SO-MTBC para la identificación de los miembros del complejo <i>M.tuberculosis</i> | 113 |

Índice

| | |
|---|-----|
| 5.3 Descripción las características clínico-epidemiológicas de los casos de tuberculosis diagnosticados en el Área Norte de Granada desde 2011 hasta 2014.. | 119 |
| 6. CONCLUSIONES | 124 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA..... | 128 |
| 8. ANEXO. PUBLICACIÓN CIENTÍFICA..... | 150 |

ABREVIATURAS

AAR: Ácido alcohol resistente

ADN: Acido Desoxirribonucleico

ADPV: Adicto a drogas por vía parenteral

AEE: Área Económica Europea

ATP: Adenosin trifosfato

BAAR: bacilos ácido-alcohol resistentes

BCG: Bacilo de Calmette-Guerin

CMA: *Mycobacterium avium* complex

CMBD: conjunto mínimo de datos básicos

CMI: Concentración mínima inhibitoria

DMT: Direct *Mycobacterium tuberculosis*

dNTP: desoxi nucleotidos trifosfato

DOST: directly observed therapy short-course

E: etambutol

EM: espectrometría de masas

ESAT-6: early secretory antigen target-6

F: forward

G+C: Guanina y Citosina

GLC: Cromatografía de gases

HPLC: Cromatografía líquida de alta presión

HUCH: Hospital Universitario Carlos Haya

HUVN: Hospital Universitario Virgen de las Nieves

IGRAs: Interferon-Gamma Release Assays

IL: Interleukina

INF- γ : Interferón gamma

INH: Isoniazida

ITS: internal transcribed spacer

LAM: Lipoarabinomanano

MALDI TOF: Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight

MDR: multi drugs resistance (multirresistencia)

MGIT: Mycobacteria growTh indicator tube

MIRU: Análisis de las unidades micobacterianas repetitivas intercaladas

MNT: Micobacterias no tuberculosas
MTBC: *Mycobacterium tuberculosis* complex
NO: Óxido nítrico
OMS: Organización Mundial de la Salud
ORF: Open Reading Frame (marco abierto de lectura)
PAS: ácido paramino-salicílico
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
R: reverse
RD: Región de delección/ región de diferenciación
RFLP: polimorfismo de longitud del fragmento de restricción
RIF: Rifampicina
RRPM: Receptores que reconocen patrones moleculares
S: estreptomicina
SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNC: Sistema nervioso central
SO-DMT: Speed Oligo® Direct *Mycobacterium tuberculosis*
SO-MTBC: Speed Oligo® *Mycobacterium tuberculosis* complex
TB: Tuberculosis
TDO: Tratamiento directamente observado
TLR: Toll-like receptor
TNF- α : Factor de necrosis tumoral
UDPV: usuarios de drogas por vía parenteral
UE: Unión Europea
VIH: virus de la inmunodeficiencia humana
XDR: extremely drug resistance (extremadamente drogorresistente)
Z: Pirazinamida

▶ INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

1.1.1 Aspectos microbiológicos y taxonomía del género *Mycobacterium*

Las micobacterias son un grupo de microorganismos de gran importancia clínica, ya que existen múltiples especies que son agentes causales de diversas infecciones humanas con una importante morbilidad y mortalidad. La tuberculosis es una enfermedad infecciosa y transmisible de distribución universal, con una historia de progresiva agresión a la especie humana ¹.

Las micobacterias son microorganismos aerobios estrictos, inmóviles, de morfología variable (bacilar o cocoide), que no forman esporas y no poseen flagelos ni cápsula. Presentan un elevado contenido de G+C (65,9%) en su ADN ^{2,3}. Esto es compartido por otros géneros relacionados que también poseen ácidos micólicos en la pared celular, como son *Gordonia* spp., *Tsukamurella* spp, *Nocardia* spp. y *Rhodococcus* spp. ⁴ Un aspecto relevante de estos microorganismos es su mayor resistencia, respecto a otras bacterias no formadoras de esporas, a los ácidos, álcalis y determinados desinfectantes químicos. Además son muy resistentes a la desecación y congelación. Sin embargo, son sensibles a los rayos ultravioleta. También el calor (pasteurización) y determinados productos como el óxido de etileno, formaldehído, etanol (70%), glutaraldehído (2%), ácido peracético o peróxido de hidrógeno estabilizado, entre otros, son eficaces contra estas bacterias ⁴.

Poseen una pared celular gruesa (Figura 1) y con un elevado contenido lipídico, en la cual se diferencian de interior a exterior tres capas ⁵:

- La capa interna está compuesta por una estructura de peptidoglucano, que contiene N-acetilglucosamina y ácido N-glucolilmurámico. Esta capa presenta puentes peptídicos entre sus cadenas, lo que confiere rigidez a la pared celular.
- La capa media está formada por polisacáridos de D-arabinosa y D-galactosa, constituyendo el arabinogalactano, unido por unión covalente al peptidoglucano de la capa interna. Dicho arabinogalactano está esterificado con ácidos grasos de elevado peso, los llamados ácidos micólicos (principales lípidos de la pared),

Introducción

formando moléculas de arabinogalactano-micolato, estructura única de las micobacterias.

- Por último, la capa externa está formada por una capa de glucolípidos y péptidos. Estos glucolípidos establecen uniones no covalentes con los ácidos micólicos. Otro lípido de esta pared es el factor cordón o *cord factor* (6'6'-dimicolato de trehalosa), responsable de la alineación paralela de hileras de bacilos (formación de “cordones”), característica de las cepas virulentas de *M. tuberculosis*.

En conjunto, esta composición de la pared le confiere a la micobacteria una escasa permeabilidad celular, responsable entre otras cosas, de la ineficacia de múltiples agentes antimicrobianos, y una impermeabilidad a los agentes hidrofílicos utilizados frecuentemente en determinadas tinciones para visualización microscópica.⁶ Por este motivo las micobacterias no se tiñen correctamente con los reactivos utilizados en una tinción de Gram. Sin embargo, sí se tiñen bien con la tinción de Ziehl-Neelsen, que utiliza como solución decolorante una mezcla de alcohol y ácido clorhídrico. Una vez coloreadas, las micobacterias son resistentes a la decoloración ácido-alcohólica; de ahí que se les llame bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR)⁴.

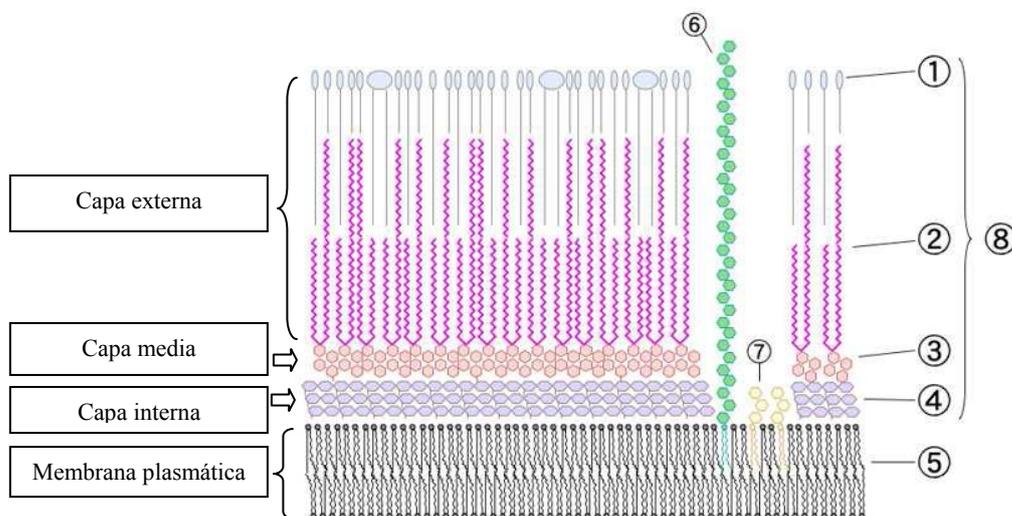


Figura 1: Estructura de la pared celular micobacteriana.

1-lípidos externos, 2-ácido micólico, 3-polisacáridos (arabinogalactano), 4-peptidoglicano, 5-membrana plasmática, 6-lipoarabinomanano (LAM), 7-fosfatidilinositol manosido, 8-esquema de la pared celular.

Tomado de Gorocica et al.⁵

Introducción

En la membrana plasmática de las micobacterias se encuentra anclado el lipoarabinomano (LAM), equivalente al lipopolisacárido de las bacterias Gram negativas. En las cepas de micobacterias más virulentas, la arabinosa terminal del LAM está recubierta con residuos de manosa (manLAM) a diferencia de las cepas no virulentas, que no están recubiertas (araLAM). Estos componentes de la pared, intervienen en la patogenia y favorecen la supervivencia del microorganismo en el interior de los macrófagos.

La gran mayoría de las micobacterias de interés clínico tienen un crecimiento muy lento con un tiempo de multiplicación de 15 a 18 horas en condiciones favorables, el cual se ve estimulado por la presencia de CO₂ y ácidos grasos. De ahí que sean necesarias de 1 a 3 o más semanas de incubación para obtener un crecimiento apreciable en los medios de cultivo convencionales.

El nombre genérico *Mycobacterium* (bacteria fúngica) fue introducido por primera vez por Lehmann y Neumann debido al crecimiento en forma de hongo del bacilo en medios líquidos⁷. El género *Mycobacterium* pertenece al orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacteriaceae* y a la familia *Mycobacteriaceae*⁸. Dentro del género *Mycobacterium* se han descrito ya más de 150 especies saprófitas y patógenas que pueden clasificarse de múltiples maneras. Hace años, según la velocidad de crecimiento, la morfología y capacidad de pigmentación de las colonias en medios sólidos, las micobacterias se dividieron en diversos grupos. Así, se establecieron dos grupos clásicos: micobacterias de crecimiento lento y rápido según requieran más o menos de 7 días, respectivamente. Y por otro lado, se combinaba la posibilidad de no producir pigmento (no cromógenas) o hacerlo en ausencia (escotocromógenas) o presencia de la luz (fotocromógenas). De esta forma surgieron 4 grupos con cierta transcendencia clínica⁹. Una modificación de esta clasificación se muestra en la Tabla 1. En la actualidad, ante la incesante aparición de nuevas especies y las diferentes características fenotípicas que algunas de ellas pueden adoptar, se prefiere realizar una individualización al nivel de especie.

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

Tabla 1: Clasificación modificada de Runyon de las micobacterias más frecuentemente aisladas en muestras clínicas. Tomado de Runyon E. ⁹

1.1.1.1 Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Este complejo incluye 8 especies patógenas que son las siguientes¹⁰ (Tabla 2):

| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex |
|---|
| <i>M.tuberculosis</i> |
| <i>M.bovis</i> |
| <i>M.bovis BCG</i> |
| <i>M.africanum</i> |
| <i>M.caprae</i> |
| <i>M.microti</i> |
| <i>M.canettii</i> |
| <i>M.pinnipedii</i> |

Tabla 2: Miembros del complejo *M.tuberculosis*

M. tuberculosis es la principal causa de tuberculosis humana en casi todo el mundo e infecta a más de un tercio de la población mundial¹¹. Los seres humanos constituyen el único reservorio para *M.tuberculosis* aunque numerosos animales (algunas aves, primates, elefantes y otros mamíferos) son sensibles a la infección^{12,13}.

La aparición de colonias rugosas, no pigmentadas de crecimiento lento y aspecto de migas de pan suele ser característica de *M. tuberculosis* (Figura 2).

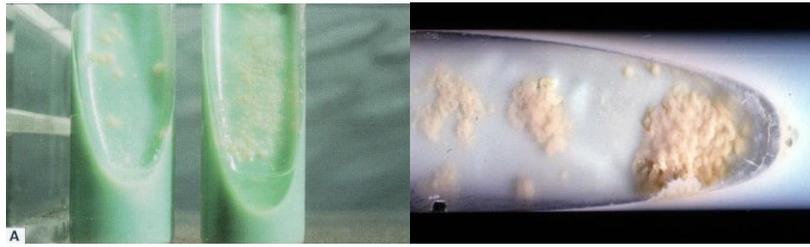


Figura 2: Aspecto de las colonias de *M. tuberculosis* en Lowenstein-Jensen

M. bovis produce tuberculosis en animales salvajes y domésticos; el ganado bovino es el mayor reservorio de esta especie, lo que también produce, con relativa frecuencia, enfermedad en el hombre^{14,15}. El mecanismo de transmisión en el ganado es por inhalación y por ingestión. La tuberculosis zoonótica está todavía muy presente en animales de países en vías de desarrollo, donde las actividades de control y vigilancia son inadecuadas o no se realizan, y tanto el ganado domesticado como el salvaje, que actúa como reservorio, comparten zonas de pasto. La epidemia de infección por el VIH en países en vías de desarrollo, particularmente en aquellos en los que la infección por *M.bovis* está presente en animales y las condiciones socio-sanitarias favorecen la transmisión zoonótica convirtiendo esta infección en un serio problema de salud pública. La infección por *M.bovis* es menos frecuente en países industrializados debido al control de los animales y a la pasteurización de la leche, donde se ha luchado contra el reservorio animal¹⁶. El carácter relativamente microaerófilo de *M.bovis* contrasta con el aerobio de *M.tuberculosis*; esto explica por qué *M.tuberculosis* se asocia más comúnmente con enfermedad pulmonar, mientras que *M.bovis* se asocia con mayor frecuencia con formas extrapulmonares.

M. bovis BCG es una variante avirulenta obtenida en el laboratorio a partir de una cepa de *M. bovis* que por sucesivos pases perdió su poder patógeno y mantuvo su capacidad antigénica¹⁷; actualmente se la utiliza como vacuna para la prevención de la tuberculosis, como vehículo recombinante para otras vacunas y como tratamiento para el cáncer de vejiga^{18,19}. Una de las posibles reacciones adversas aunque muy infrecuentes de éste tratamiento que se administra en forma de instilaciones intravesicales es la diseminación del bacilo e infección en casi cualquier parte del organismo. Lo más frecuente es la localización urinaria²⁰ aunque se han descrito diversas localizaciones causando artritis reactiva²¹, neumonitis, hepatitis y sepsis²² entre otras.

M. africanum causa la mitad de los casos de tuberculosis en humanos en África aunque también se ha descrito como agente causal de tuberculosis en otros países europeos (Francia, Inglaterra, España, Alemania...) ²³. Se ha aislado esporádicamente en animales (monos y vacas) aunque no está claro que puedan actuar como reservorios de la enfermedad ²⁴. *M. africanum* produce una clínica similar a *M. tuberculosis*, y se ha descrito principalmente la forma pulmonar, aunque también algunos casos de formas diseminadas. Se han descrito dos subgrupos mayores de *M. africanum* que se corresponden con distintas zonas geográficas: el subtipo I en el oeste africano, más cercano a *M. bovis* y el subtipo II en el este africano, más cercano a *M. tuberculosis* ²⁵.

M. caprae ²⁶ infecta a las cabras y al ganado en general. Se ha descrito como el mayor agente causal de tuberculosis bovina tanto en animales como en humanos en el centro de Europa ^{27,28}. El cuadro clínico es análogo al producido por *M. tuberculosis*. En humanos se han descrito diferentes formas clínicas: pulmonar, linfática, urinaria, lupus vulgar, meningitis y pericarditis ²⁹⁻³³.

M. canettii es patógeno exclusivamente humano y tiene un reservorio ambiental desconocido. Se considera el progenitor de las demás especies del complejo y los casos descritos están limitados al cuerno de África (concretamente en la República de Yibuti) ^{34,35}.

M. microti ^{36,37} afecta a pequeños roedores ^{38,39} y se ha encontrado en muestras de tejido de nódulos linfáticos de jabalís salvajes ⁴⁰. Ha sido identificado como agente causal de tuberculosis en humanos, tanto inmunocompetentes como inmunodeprimidos ⁴¹.

M. pinnipedii ⁴² es la especie que causa tuberculosis en pinnípedos, se aísla mayoritariamente en focas de varios continentes. Se ha descrito algún caso de posible transmisión de animales a humanos ⁴³. También recientemente se han descrito casos de infección en ganado de Nueva Zelanda ⁴⁴.

Hasta los últimos años la única manera de distinguir los miembros del complejo era mediante la realización de pruebas bioquímicas (Tabla 3). En comparación con *M. tuberculosis*, las pruebas de producción de niacina y de reducción de nitratos son negativos en *M. bovis*, pero el resto de características bioquímicas son indistinguibles: produce catalasa termosensible (positiva a temperatura ambiente e inactivada a 68°C) y la tolerancia a la sal es negativa. El crecimiento en medio Löwenstein-Jensen es pobre en presencia de glicerol, y mejor en presencia de piruvato. El medio BACTEC (Becton Dickinson) no contiene glicerol, por lo que favorece el crecimiento de *M. bovis*.

Los resultados de las pruebas bioquímicas convencionales son a menudo ambiguos, difíciles de reproducir y, en cualquier caso, el tiempo requerido para su realización es largo, dado que se requiere un crecimiento abundante.

| | <i>M.tuberculosis</i> | <i>M.africanum</i> | <i>M.bovis</i> | <i>M.bovis</i> BCG | <i>M.microti</i> | <i>M.canettii</i> | <i>M.caprae</i> | <i>M.pinnipedi</i> |
|--------------------------|-----------------------|--------------------|----------------|--------------------|------------------|-------------------|-----------------|--------------------|
| Niacina | + | + | - | - | + | - | - | V |
| Nitratasa | + | +/- | - | - | - | + | - | - |
| Ureasa | +/- | + | +/- | + | + | ND | ND | ND |
| Tipo respiratorio | AE | MicroAE | MicroAE | AE | | | | |
| TCH (10µg/ml) | R | V | S | S | S | R | S | ND |
| Pirazinamida | S | S | R | R | S | S | ND | ND |
| Cicloserina | v | V | S | R | ND | ND | ND | ND |

Tabla 3: Pruebas bioquímicas para la diferenciación de las especies del complejo.

TCH: hidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico; S: sensible; R: resistente; V: variable; AE: aerobio; MicroAE: microaerófilo; ND: dato no disponible. Modificado de Alcaide Fernández de Vega et al.⁶

1.1.2 Genética de las micobacterias

La falta de conocimiento genético en las micobacterias impidió la implantación de una estrategia nacional para el control de la tuberculosis hasta el desarrollo de la genómica. Las dificultades para manipular las micobacterias genéticamente; su crecimiento extremadamente lento y su patogenicidad hicieron de ella un modelo poco atractivo como sistema genético. A pesar de que el potencial de la investigación genética micobacteriana está todavía por desarrollarse completamente, el entendimiento de cómo los genomas micobacterianos están organizados, la manera en que los genes están expresados y la determinación genética de los fenotipos característicos ha sido asombroso⁴⁵.

En la actualidad se conocen las secuencias genómicas completas de las principales micobacterias: *M.tuberculosis* H37Rv², *M.leprae*⁴⁶, *M.bovis* AF2122/97⁴⁷, *M.bovis* BCG⁴⁸. Están disponibles en diversas bases de datos online

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://tuberculist.epfl.ch/>, <http://www.microbesonline.org/> lo que ha permitido el uso de técnicas de genómica comparativa, que son de gran utilidad para la investigación de diferencias entre éstas cepas, no solamente diferencias individuales entre genes, sino genomas completos.

Posteriores reanotaciones del genoma de *M. tuberculosis*⁴⁹ y actualizaciones de las bases de datos (<http://tuberculist.epfl.ch/>) constatan que posee un contenido importante en G+C (65.9%) relativamente constante a lo largo de toda la secuencia. Alberga alrededor de 4090 genes (4411532 pares de bases y 3924 ORFs identificados) y llama la atención por la elevada proporción de su capacidad codificante destinada a la expresión de enzimas implicadas en lipogénesis y lipólisis. De hecho, pocas bacterias son capaces de sintetizar una gama de moléculas lipofílicas tan variada como *M. tuberculosis*. Esto resulta decisivo para la patogenia, así como para la obtención de energía, la degradación de lípidos propios de las membranas celulares o vacuolares de huésped.

Se trata de un genoma rico en ADN repetitivo, especialmente en forma de secuencias de inserción, como la IS6110, de la que se han hallado 16 copias, pero también son fuentes de repetición las nuevas familias multigénicas y genes *housekeeping* duplicados. Pese a que la tasa de duplicación es similar a la de otros microorganismos, el grado de conservación es considerablemente superior.

En cuanto a la polaridad de los genes, se tiene que un 59% se transcriben en la misma dirección que sucede la replicación, hecho que viene reflejado en su lento crecimiento.

Los 3924 ORFs identificados suponen un 91% de la capacidad codificante del genoma, esto es, está muy explotado. Haciendo uso de la información disponible en bases de datos, y estableciendo comparaciones de secuencias, se ha atribuido función precisa a un 40% de los ORFs predichos, y para otro 44% se ha encontrado secuencias similares o información relacionada. El 16% restante alberga genes de función desconocida².

En cuanto a la composición aminoacídica, los datos guardan coherencia con el contenido elevado en guanina/citosina; en efecto, predominan aminoácidos del tipo alanina, glicina, prolina, arginina y triptófano, puesto que son los codificados por codones ricos en G+C, frente a unos aminoácidos menos representados como son la asparagina, isoleucina, lisina, fenilalanina y tirosina.

Además el genoma del bacilo tiene el potencial de sintetizar todos los aminoácidos esenciales, las vitaminas y los cofactores enzimáticos, aunque algunas de las rutas metabólicas pueden ser diferentes a las encontradas en otras bacterias⁵⁰. *M. tuberculosis*

tiene la capacidad de sintetizar muchos de los componentes esenciales lo cual tiene un impacto importante en la supervivencia del bacilo en diferentes ambientes de su ciclo biológico⁵¹.

Por otro lado, el genoma de *M. tuberculosis* difiere respecto al resto de bacterias por poseer dos nuevas familias de proteínas ricas en glicina, las PE (motivos Pro-Glu a nivel del extremo N-terminal) y las PPE (Pro-Pro-Glu)⁵², cuya estructura repetitiva proporciona una fuente importante de variabilidad antigénica. Estas proteínas son específicas de las micobacterias, ya que no muestran similitud con otras proteínas conocidas⁵³. La familia PE por ejemplo, se compone de 90 miembros que comparten un dominio en el extremo N-terminal muy conservado, consistente en 110 residuos aminoacídicos que se disponen dando lugar a una estructura globular, mientras que el extremo C-terminal varía en secuencia, longitud y número de repeticiones. Estudios filogenéticos han llevado a subdividir la familia en distintos grupos, siendo el más numeroso el de las PGRS (*glycine-rich proteins*), cuyo contenido en glicina supera el 50%, y se distribuye en forma de repeticiones en tándem del motivo Gly-Gly-Ala/Asn.

Desde que en 1998 se publicara el genoma de la cepa H37Rv, otras cepas aisladas de pacientes han sido secuenciadas. Se han empleado microarrays para analizar genomas completos y realizar así estudios epidemiológicos en cepas clínicas de *M. tuberculosis*, detectándose hasta 25 regiones cromosómicas delecionadas. Parece ser que estas deleciones tienen lugar como consecuencia de la recombinación homóloga entre copias de IS6110 que se hallan flanqueando ciertas regiones cromosomales. Muchos datos indican que *M. tuberculosis* ha sufrido en su evolución un reciente *bottleneck* (cuello de botella) en el momento de la especiación, y que se calcula que tuvo lugar hace 15000 o 20000 años⁵⁴. Debido a ésta evolución a partir de un único ancestro clonal⁵⁵ las especies del complejo *M.tuberculosis* comparten el 99,9% de identidad en las secuencias pero difieren ampliamente sus tropismos por el hospedador, fenotipos y patogenicidad⁵⁴. Actualmente y gracias a la secuenciación genómica se pueden utilizar técnicas de biología molecular para la diferenciación de las especies acortando de forma considerable el tiempo de análisis.

Se han descrito tres tipos de regiones diferenciales en el genoma de *M.tuberculosis*⁵⁴; en primer lugar se incluyen elementos genéticos móviles (profagos, secuencias de inserción...) que se distribuyen a lo largo del genoma; en segundo lugar la pérdida de segmentos de DNA provocada por recombinación homóloga siendo variable de unas cepas a otras; y por último, deleciones de DNA (RD1, RD2, RD4, RD7, RD8, RD9,

RD10, RD12, RD13, RD14 Y TbD1) por mecanismo desconocido que en algunos casos afecta a regiones codificantes.

Las cepas de *M.tuberculosis* tienen presente la mayoría de las regiones RD, lo que implica que es una especie altamente conservada en comparación con el resto de micobacterias del complejo y que a partir de ella han ido surgiendo el resto de las especies por mecanismos de deleciones genéticas, como se propone en la Figura 3.

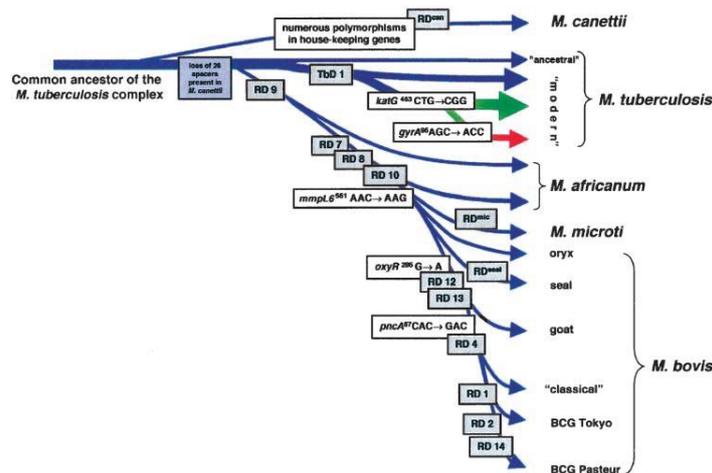


Figura 3: Esquema de la evolución del bacilo tuberculoso mediante la sucesiva pérdida de ADN.

Tomada de Brosch et al. ⁵⁴

Cada una de estas regiones contienen genes con diferentes funciones⁵⁶. En la Figura 4 se puede observar la localización de las regiones delecionadas de *M.bovis* BCG con respecto al genoma de *M.tuberculosis*, así como los genes codificados en cada una de ellas.

- La región RD1 contiene 8 genes, la mayoría de los cuales pertenecen al *cluster esat6*. ESAT6 es un potente inductor del sistema inmune y un antígeno reconocido en las fases tempranas de la infección. Esta región está ausente en *M.bovis* BCG y *M.microti* ⁵⁷⁻⁶¹.
- La región RD3 corresponde a uno (phiRv1) de los dos (phiRv1 y phiRv2) profagos presentes en el genoma de *M.tuberculosis*. Esta región está ausente en *M.bovis* BCG posiblemente se perdió durante la atenuación de la cepa de *M.bovis* para crear la vacuna. En otros miembros del complejo la presencia de ésta región es variable^{54,56,62}.

Introducción

- En la región RD4 están codificadas proteínas similares a las de membrana y enzimas implicadas en la biosíntesis de lipopolisacáridos. Esta región está ausente en *M.bovis* y *M.bovis BCG*^{57,58,63-67}.
- La región RD5 comprende 3 de los 4 genes que codifican la fosfolipasa C en *M.tuberculosis*. Además también contiene genes que codifican proteínas de la familia ESAT-6 y para la familia de proteínas PPE. Esta región está ausente en *M.bovis*, *M.bovis BCG*, *M.microti* y *M.caprae*^{62,66,68}.
- La región RD6 contiene la secuencia de inserción IS1532 y genes que codifican proteínas de la familia PPE. Está ausente en *M.bovis*, *M.bovis BCG*, *M.africanum* y *M.microti* y también en algunos aislados de *M.tuberculosis*^{56,68}.
- La región RD7 contiene el operón *mce3*, que está ausente en algunos miembros del complejo *M.tuberculosis* que no son patógenos humanos, lo que sugiere que puede jugar un papel importante en la enfermedad humana^{56,58,66,67}.
- La región RD8 contiene uno de los seis genes que codifican epóxido hidrolasas (EphA-F), enzimas encargadas de la detoxificación. Al igual que RD1 y RD5, RD8 también contiene genes que codifican para proteínas de la familia ESAT-6. Esta región está ausente en *M.bovis*, *M.caprae* y *M.microti*^{58,66,67}.
- En la región RD9 se encuentran genes que codifican una oxidorreductasa (precorina metiltransferasa) implicada en la síntesis de cobalamina y otras proteínas. Esta región está ausente en *M.africanum* y *M.microti*^{57,58,60,62-64,66,67}.
- En RD10 está codificada una enoilCoA reductasa y una aldehído deshidrogenasa. Está ausente en *M.microti*, *M.bovis* y *M.bovis BCG*^{58,62,66}.
- La región RD11 corresponde con el segundo profago (phiRv2) estando presente en la mayoría de las cepas de *M.tuberculosis* junto con phiRv1 y ausente en *M.bovis*^{62,66}.
- Las regiones RD12 y RD13 contienen genes que codifican para una tiosulfato sulfurotransferasa, una meteltransferasa, el citocromo P450 (RD12), un regulador transcripcional y una dehidrogenasa (RD13). Ambas regiones están ausentes en *M.bovis* y *M.bovis BCG* pero presentes en *M.microti*. RD12 está ausente en *M.caprae*^{58,64-66}.
- RD14, RD15 y RD16 son deleciones específicas de *M.bovis BCG*⁶⁶.

Introducción

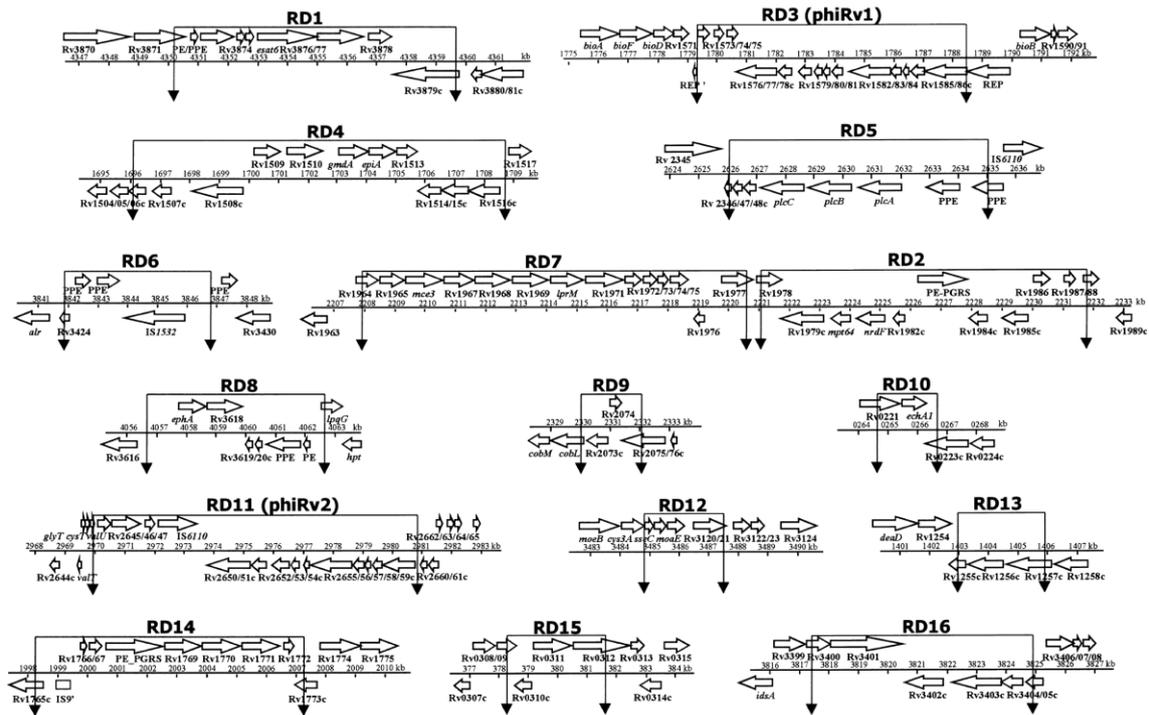


Figura 4: Regiones delecionadas en *M. bovis* BCG con respecto a *M. tuberculosis* H37Rv.

Tomada de Brosch et al. ⁵⁶

1.1.3 Patogenia de la infección.

M. tuberculosis entra en el organismo a través de las vías aéreas y la implantación tiene lugar preferiblemente en las zonas bajas y medias del pulmón ya que estas áreas tienen proporcionalmente una mayor ventilación. Sin embargo puede afectar a cualquier lóbulo⁶⁹.

En la mayor parte de las ocasiones, los bacilos son fagocitados y destruidos por los macrófagos⁷⁰⁻⁷², de modo que un elevado porcentaje de casos, alrededor del 90%, mantendrá controlados los bacilos en estado latente durante toda la vida. Si el macrófago no puede inhibir o destruir a los bacilos, se multiplicarán en éste ambiente intracelular, esto ocurre, en torno al 10% de las personas infectadas por la bacteria⁷³; la mitad de ellos lo hará tempranamente, en los dos primeros años tras la infección, mientras que el 5% restante necesitará, sin embargo, de un largo período de tiempo, varias décadas a veces, para que se produzca la reactivación endógena de lesiones (granulomas o tubérculos) aparentemente curadas, que albergan en su interior micobacterias potencialmente viables; en tales casos, se denomina tuberculosis de reactivación o post-primaria⁷⁴. *M. tuberculosis* puede diseminarse por vía hematogena e

implantarse en cualquier otro lugar del organismo y allí multiplicarse para dar lugar a distintas manifestaciones clínicas⁷⁵ (Figura 5).

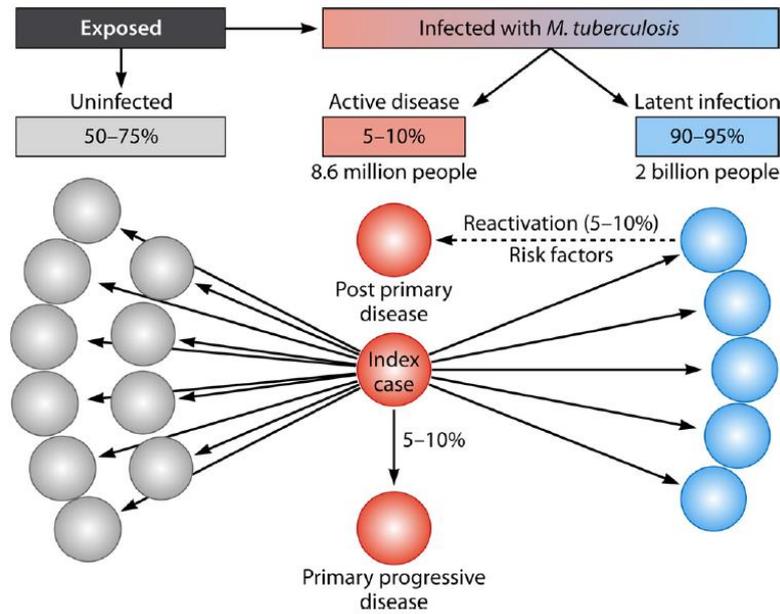


Figura 5: Diseminación de *M.tuberculosis*. Tomado de Wlodarska et al.⁷²

En la infección primaria los bacilos fagocitados provocan una respuesta pro-inflamatoria que induce a los macrófagos a invadir el epitelio, produciéndose el reclutamiento de células mononucleares de los tejidos adyacentes. Estos macrófagos forman el entramado celular del granuloma temprano, que es la característica primaria de esta enfermedad. Además este núcleo de macrófagos está rodeado por macrófagos espumosos (altamente vacuolados) y otros fagocitos mononucleares, rodeados por linfocitos. A medida que el granuloma madura se desarrolla una cápsula fibrosa extensa que encierra al núcleo de macrófagos y excluye a la mayoría de los linfocitos del centro de la estructura. Parece ser que los macrófagos espumosos son las células responsables de la acumulación de restos caseosos en el centro del granuloma, que augura la progresión hacia enfermedad activa⁷⁶. El centro caseificado es una localización muy atractiva para la micobacteria. Estas lesiones, que pueden llegar a encapsularse, aíslan a la bacteria que tendría que hacer frente a condiciones anaerobias permaneciendo inactiva durante la vida del hospedador inmunocompetente.

Sin embargo, en una infección progresiva, el centro necrótico caseificado del granuloma se licua y las cavidades vierten miles de agente infecciosos a las vías aéreas. El daño pulmonar provoca el desarrollo de tos productiva, que facilita la generación de aerosoles

infecciosos y la finalización del ciclo vital de la bacteria. El ciclo biológico de *M.tuberculosis* en el hospedador está descrito en la Figura 6.

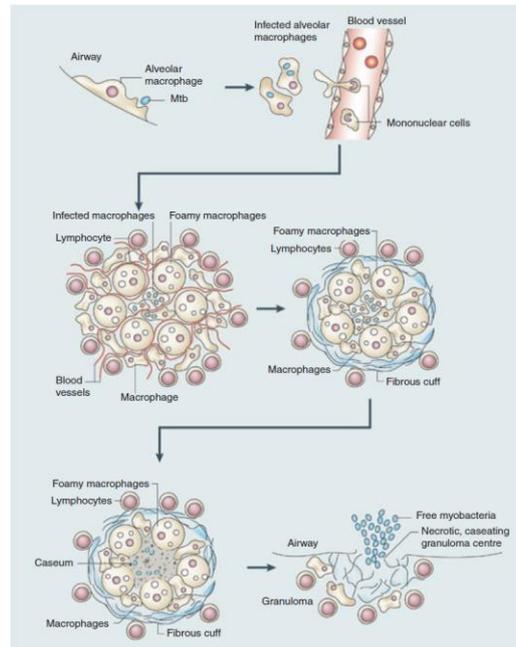


Figura 6: Ciclo biológico de *M.tuberculosis*. Tomada de Russell et al.⁷⁶

1.1.4 Cuadros clínicos

Los signos y síntomas clínicos de la tuberculosis son el reflejo de la localización de la infección y la enfermedad primaria normalmente se restringe a las vías respiratorias inferiores.

1.1.4.1 Tuberculosis respiratoria

La tuberculosis pulmonar tiene manifestaciones clínicas inespecíficas, e incluso puede detectarse en personas asintomáticas⁷⁵. Lo habitual es que el paciente presente síntomas de varias semanas de duración consistentes en tos, expectoración, en ocasiones hemoptoica, dolor torácico y sintomatología general como febrícula o fiebre, sudoración, astenia, anorexia y pérdida de peso⁴. La exploración torácica puede ser anodina, o bien pueden auscultarse ruidos o estertores localizados o asimetrías en los ruidos respiratorios. La clínica de la tuberculosis pleural consiste en dolor torácico, sensación de disnea, fiebre o febrícula, con o sin sintomatología general.

La tuberculosis también puede afectar a los ganglios hiliares y mediastínicos, y asociarse o no a otras formas torácicas y/o linfadenitis cervical. La afectación ganglionar es más frecuente en niños. Otra estructura torácica que puede verse afectada por la tuberculosis es el pericardio, que se manifiesta como un derrame pericárdico o pericarditis constrictiva, que puede aparecer solo o asociado a una pleuritis u otra forma de tuberculosis torácica.

1.1.4.2 Tuberculosis extra-respiratoria

M. tuberculosis puede diseminarse por vía hematógena e implantarse en cualquier otro lugar del organismo y allí multiplicarse para dar lugar a distintas manifestaciones clínicas que dependerán del lugar de afección (Tabla 4). Del mismo modo que en la tuberculosis pulmonar, la tuberculosis extratorácica puede verse acompañada de sintomatología sistémica, aunque se observa con menor frecuencia. La pérdida de peso es más habitual en la tuberculosis diseminada y en la localización gastrointestinal⁷⁷. La mayoría de las formas de tuberculosis extrapulmonar se asocian a una carga bacilar escasa (formas paucibacilares).

- Tuberculosis del sistema nervioso central (SNC): La meningitis tuberculosa es la forma más frecuente de presentación de tuberculosis en el SNC y su pronóstico es fatal sin tratamiento. El retraso en el inicio del tratamiento es el factor de riesgo más importante para la muerte⁷⁸. Los síntomas suelen comenzar con malestar general, dolor de cabeza intermitente y fiebre de bajo grado, seguido de 2 a 3 semanas con dolor de cabeza intenso, vómitos, confusión, meningismo y signos neurológicos⁶⁹. Los tuberculomas, abscesos cerebrales, la hidrocefalia con hipertensión intracraneal y los infartos isquémicos secundarios a vasculitis son otras formas graves de presentación de la tuberculosis en el SNC.

- Tuberculosis osteoarticular: La localización vertebral es la más frecuente (espondilodiscitis tuberculosa o enfermedad de Pott). La sintomatología inicial es muy inespecífica, de evolución lenta y falta de sintomatología constitucional. Puede aparecer dolor local y rigidez⁷⁹. En casos avanzados la infección se extiende a las partes blandas adyacentes, pudiendo afectar al canal medular y originar compresión medular. Las localizaciones más frecuentes son la columna torácica en los pacientes jóvenes y la lumbar en los mayores. También extenderse al espacio articular adyacente provocando

artritis de origen tuberculoso afectando sobre todo a las articulaciones de cadera y rodilla⁶⁹.

- Tuberculosis urinaria: la sintomatología es inespecífica o incluso asintomática en fases iniciales de la localización renal. Representa hasta el 27% de los casos de tuberculosis extrarrespiratoria⁸⁰. Si la enfermedad se extiende por el uréter y la vejiga los signos y síntomas de inicio más frecuentes son polaquiuria, disuria y hematuria. En los uréteres y la vejiga puede producir fibrosis, estrechamiento o incluso obstrucción del trayecto urinario.

- Tuberculosis genital: en varones se pueden afectar la próstata, el epidídimo y con menor frecuencia los testículos y las vesículas seminales. La localización prostática se manifiesta en forma de molestias locales, polaquiuria, urgencia miccional o hematospermia. En las mujeres, la trompa de Falopio es la localización ginecológica presente en más de las 80% de las tuberculosis genitales femeninas. Habitualmente es bilateral y se afecta también el endometrio. Las pacientes inician la clínica con dolor abdominopélvico sin fiebre. Aunque de escasa prevalencia en España, es una de las causas más frecuentes de infertilidad en el mundo⁷⁵.

- Tuberculosis ganglionar: la localización más frecuente es en los ganglios linfáticos cervicales y de la región supraclavicular. No suele acompañarse de sintomatología constitucional ni fiebre⁷⁷. Las adenopatías tienden a crecer gradualmente incluso a pesar de un tratamiento eficaz y en principio son de consistencia rígida e indolora.

- Tuberculosis miliar: ocurre una diseminación hematógena a múltiples órganos. Es una de las presentaciones más graves de la tuberculosis y puede ser una manifestación primaria o una reactivación precoz o tardía, incluso años después⁸¹. El cuadro clínico es variable, con síntomas insidiosos como fiebre o febrícula y malestar general, con un examen físico anodino.

- Tuberculosis laríngea: actualmente ocurre en menos del 1% de pacientes con tuberculosis. Se produce fundamentalmente por extensión local procedente del árbol bronquial. El signo más frecuente es la disfonía que debe hacer sospechar esta afección, aunque también puede cursar con disfagia, tos, estridor, hemoptisis⁸². La tuberculosis laríngea se suele asociar a tuberculosis pulmonar bacilífera, y por lo tanto es una forma altamente contagiosa.

Introducción

- Tuberculosis cutánea: generalmente es una manifestación de enfermedad sistémica. Las manifestaciones de la tuberculosis cutánea dependen de la situación inmunitaria del paciente⁷⁵.

- Tuberculosis gastrointestinal: puede comprometer cualquier parte del tracto digestivo. La localización ileocecal es la más frecuente. El páncreas, las vías biliares y el hígado también se pueden afectar⁸³. Además de la etiología primaria, puede deberse a deglución de bacilos en pacientes con tuberculosis pulmonar, o a la ingestión de leche contaminada no pasteurizada, inoculándose en el tracto intestinal⁶⁹.

| | Locales | Sistémicos |
|--|---|---|
| Tuberculosis pleural | <ul style="list-style-type: none"> - Dolor pleurítico. - Derrame pleural unilateral, exudativo, linfocitario. | <ul style="list-style-type: none"> - Febrícula. - Disnea. |
| Tuberculosis ganglionar (linfática) | <ul style="list-style-type: none"> - Adenopatías preferentemente cervicales y supraclaviculares. - Inflamación, dolor, ulceración y supuración del nódulo. | <ul style="list-style-type: none"> - Síndrome constitucional en personas con infección por el VIH. - Poco frecuente en no infectados por el VIH. |
| Tuberculosis ósteoarticular | <ul style="list-style-type: none"> - Osteomielitis, artritis. - Dolor y abscesos en tejidos próximos. - Espondilitis y espondilodiscitis. - Compresión radicular y paraplejía. - Desviación de la columna y deformidades ósteoarticulares. | <ul style="list-style-type: none"> - Síndrome constitucional poco frecuente. |
| Tuberculosis del sistema nervioso central (meningitis, tuberculomas) | <ul style="list-style-type: none"> - Cefalea, signos meníngeos. - Afectación de pares craneales. - Hidrocefalia. - Trombosis de vasos cerebrales e ictus. - Hemiparesia, monoparesia. - Extrapiramidalismo. | <ul style="list-style-type: none"> - Fiebre. - Anorexia, vómitos, malestar, cambio de carácter. - Confusión, estupor, coma. - Crisis convulsivas. |
| Tuberculosis pericárdica | <ul style="list-style-type: none"> - Pericarditis exudativa o constrictiva. - Taponamiento pericárdico. | <ul style="list-style-type: none"> - Síndrome constitucional. - Hipotensión. - Disnea. |
| Tuberculosis genitourinaria | <ul style="list-style-type: none"> - Piuria, hematuria, disuria, polaquiuria, con cultivos convencionales negativos. - Dolor cólico. - Nefritis intersticial. - Epididimitis, hidrocele, prostatitis. - Metrorragia, amenorrea. | <ul style="list-style-type: none"> - Poco frecuentes. |
| Tuberculosis gastrointestinal | <ul style="list-style-type: none"> - Masa abdominal, ascitis. - Úlceras y sangrado digestivo, generalmente de tracto digestivo bajo. - Oclusión intestinal. | <ul style="list-style-type: none"> - Fiebre, pérdida de peso, diarrea. |
| Tuberculosis diseminada/miliar | <ul style="list-style-type: none"> - Predominan los síntomas sistémicos. Puede haber meningitis acompañante, sobre todo en niños, con su cortejo clínico. | <ul style="list-style-type: none"> - Malestar, fiebre, anorexia, pérdida de peso, sudoración nocturna, debilidad. - Raramente, shock y dis-trés respiratorio agudo. |
| Tuberculosis cutánea | <ul style="list-style-type: none"> - Nódulos recurrentes con signos inflamatorios. | <ul style="list-style-type: none"> - |

Tabla 4: Signos y síntomas de la tuberculosis extrapulmonar

Tomado de Guía de Práctica Clínica sobre el Diagnóstico, el Tratamiento y la Prevención de la Tuberculosis. Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre el Diagnóstico, el Tratamiento y la Prevención de la Tuberculosis⁸⁴

1.1.5 Inmunología de la tuberculosis

- Respuesta inmune innata:

El moco de la vías aéreas superiores es la primera línea de defensa con la que se enfrenta la micobacteria, ya que contiene diversos efectores solubles como la lisozima, lactoferrina, defensinas y catelicidinas^{85,86}. Durante las primeras semanas después de la exposición, el huésped prácticamente carece de defensas inmunitarias frente a la infección. Los pequeños inóculos inhalados se multiplican en los espacios alveolares o en el interior de los macrófagos. *M. tuberculosis* llega a los alvéolos donde entra en contacto con los macrófagos alveolares que constituyen la primera línea de defensa en el pulmón. El reconocimiento del bacilo se da a través de receptores que reconocen patrones moleculares (RRPM) del bacilo⁸⁷⁻⁸⁹; lo cual se traduce en la entrada de la micobacteria a la célula huésped. Este contacto inicial es crucial y definirá el control de la infección, o bien, el desarrollo de la enfermedad. Se induce la producción de moléculas como interleucina-1 (IL-1), TNF- α y óxido nítrico (NO)⁹⁰⁻⁹² que inducen la activación y orientación de la respuesta adaptativa a través del reclutamiento de linfocitos T al sitio de lesión, activación de células dendríticas y producción de citocinas y quimiocinas. A pesar de todos estos mecanismos de defensa, *M.tuberculosis* utiliza diversas estrategias para sobrevivir en el interior de los fagosomas de los macrófagos: la ureasa micobacteriana, la secreción abundante de superóxido dismutasa, catalasa, tiorredoxina y otros antioxidantes. Todo ello garantiza la supervivencia continuada del microorganismo en el interior de la célula huésped y la posibilidad de multiplicarse sin restricciones durante semanas; sin embargo a la larga sobreviene la respuesta inmune celular.

- Respuesta inmune celular:

Los mecanismos celulares efectores que coadyuvan al control de la infección están dados principalmente por el macrófago y las células T (CD4 y CD8):

Células T CD4: Especialmente la subclase Th1 que producen citoquinas como IFN- γ activando la actividad antimicrobiana en el macrófago. La interacción de TCD4 con CD40 incrementa la presentación de antígeno, actividad co-estimuladora que induce la liberación de quimiocinas y regula respuesta inmune celular. Las células T CD4 pueden

inducir apoptosis (FasL, principalmente) o lisis (perforinas y granulinas) de las células infectadas lo cual resulta de gran importancia en el control de la infección.

Células T CD8: Las funciones efectoras de las células T CD8 se caracterizan por la secreción de IFN- γ y por su respuesta citotóxica contra macrófagos infectados.

1.2 Epidemiología

1.2.1 Antecedentes históricos

La tuberculosis es una de las enfermedades más antiguas que afectan a los seres humanos. Se estima una antigüedad entre 15000 a 20000 años. Aunque existe un tratamiento antituberculoso eficaz y asequible, la tuberculosis sigue siendo un importante problema sanitario a escala mundial¹¹. Las huellas más antiguas de la tuberculosis datan del Neolítico. Paul Bartels, en 1907, describió el primer caso a partir de varias vértebras dorsales encontradas en un cementerio cerca de Heidelberg y pertenecientes a un adulto joven que vivió hacia el 5000 a.C. Se apreciaba la destrucción parcial de los cuerpos de las vértebras 4ª y 5ª. El cuadro es el característico del mal de Pott.

El término tuberculosis lo introdujo en 1839 Johann Lukas Schönlein (1793-1864), médico alemán, que lo adaptó de la palabra tubérculo, empleada ya en 1689 por su compañero inglés Richard Morton (1637-1698) para describir las lesiones características de la enfermedad.

La tuberculosis ha sido conocida con diversos nombres; en muchos textos antiguos de medicina aparece el término tisis, del griego phythisis⁹³, que significa secar, y que se utilizaba con la idea de consumirse, resultado de la caquexia originada por la afección. También podemos encontrar escritos en los que se alude a ella como peste blanca, pues la tuberculosis endémica que comenzó a principios del siglo XVII y que continuó durante 200 años ocasionó una elevada mortalidad en Europa, y recordó a la producida en épocas anteriores por la llamada peste negra.

En la segunda mitad del siglo XIX fue cuando se empezó a aceptar la naturaleza transmisible de la tuberculosis, tomando como punto de partida los trabajos de Jean Antoine Villemin, que en 1869 demostró que la enfermedad podía inocularse y, por

ello, contagiarse. Unos años más tarde, Robert Koch publicó los resultados de sus investigaciones⁹⁴ en las cuales consiguió aislar el agente etiológico causante de la tuberculosis, que le valieron el premio Nobel en 1905; se evidenciaba, de esta manera, no sólo el carácter transmisible de la enfermedad, sino también su naturaleza infecciosa⁹⁵.

A partir de la publicación del trabajo de Koch, en 1882, el 24 de marzo, fecha que actualmente consideramos el Día Mundial de la tuberculosis, se desarrollaron una serie de estudios fundamentados en propiedades específicas de la bacteria, como la tinción innovada por Ziehl⁹⁶ y Neelsen⁹⁷, basada en su característica de ácido-alcohol resistencia, el hallazgo de la reacción cutánea a la tuberculina⁹⁸ y la aplicación clínica de la técnica de Mantoux⁹⁹, o la invención de la vacuna de Calmette-Guérin¹⁰⁰.

Cuando cambió el destino de los enfermos tuberculosos radicalmente fue, sin embargo, con la llegada de los antibióticos al tratamiento de las enfermedades infecciosas¹⁰¹. El descubrimiento de la estreptomicina (S) y su uso en tuberculosis humana en 1944 sentaron las bases de la llamada era moderna de la tuberculosis, la época de la quimioterapia¹⁰². A este primer antibiótico le seguirían otros en los años y décadas posteriores. Se aprendió la principal limitación de éstas drogas: el hecho fundamental que cuando se emplean en monoterapia, con frecuencia llevan al fracaso con aparición de resistencia bacteriana. Se demostró que la asociación de dos drogas, la estreptomicina y el ácido-paramino-salicílico (PAS), retardaba o eliminaba el desarrollo de la temida resistencia bacteriana. El gran hito en el aspecto terapéutico lo constituyó la introducción de la isoniazida (H) en 1952, fármaco que volvió curable la mayor parte de los casos de tuberculosis. Posteriormente, la aparición de rifampicina (RIF) en 1970 acortó notablemente la duración del tratamiento, empleando H y R de forma combinada, y a 6 meses, con el uso terapéutico de múltiples agentes, como los anteriores y pirazinamida (Z).

1.2.2 Situación actual de la tuberculosis

La tuberculosis es la segunda causa mundial de mortalidad, después del sida, causada por un agente infeccioso. Según los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2013, 9 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1,5 millones murieron por esta causa, de las cuales 360.000 eran VIH positivas¹¹.

1.2.2.1 A nivel mundial

La tasa mundial de nuevos casos de tuberculosis ha venido disminuyendo durante cerca de un decenio. Las tasas de incidencia de la tuberculosis están disminuyendo en las seis regiones de la OMS, aunque a ritmo todavía lento (1,5% al año) (Figura 7) y la tasa mundial de mortalidad de la tuberculosis se ha reducido en un 45%, en comparación con 1990 (Figura 8). De los 9 millones de personas infectadas con *M.tuberculosis* en 2013, más de la mitad (56%) corresponden a pacientes del sur-este asiático y de las regiones del oeste del Pacífico. Aproximadamente un cuarto son de la región africana, que tiene la tasa más alta de casos y muertes por población. India y China corresponden a un 24% y 11% del total¹¹.

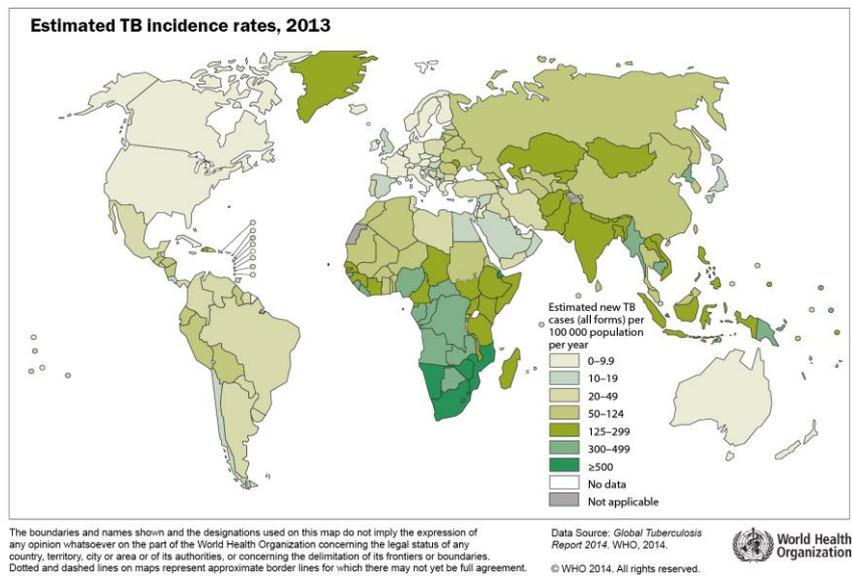


Figura 7: Tasas estimadas de tuberculosis en el mundo. Año 2013

Tomado de OMS: <http://gamapserv.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>

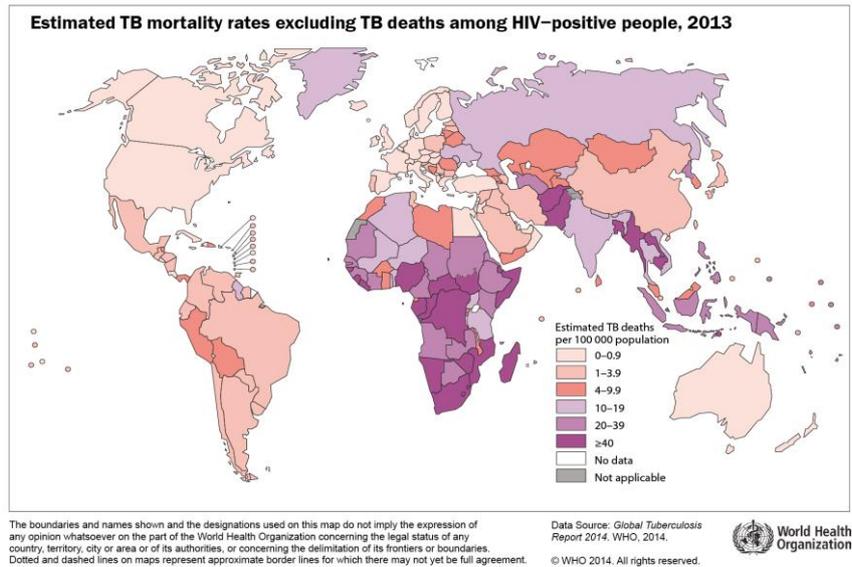


Figura 8: Tasas estimadas de mortalidad por tuberculosis (excluyendo mortalidad de tuberculosis en pacientes VIH). Año 2013

Tomado de OMS: <http://gamapservr.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>

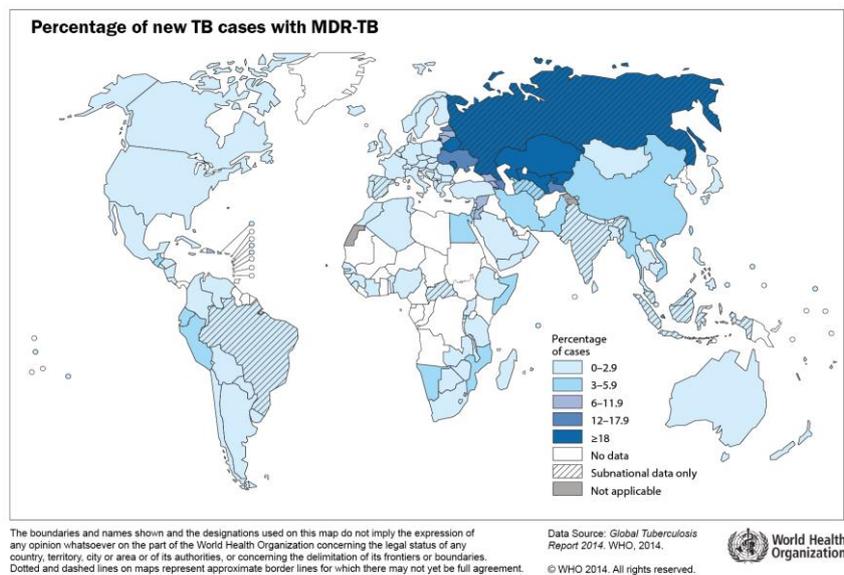


Figura 9: Porcentaje de casos nuevos de tuberculosis multiresistente (MDR-TB)

Tomado de OMS: <http://gamapservr.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>

En 2013, entre los casos notificados de tuberculosis pulmonar hubo unos 480000 casos de tuberculosis multirresistente. Esto supone, del global, un 3,5% de los casos nuevos (Figura 9) y un 20,5% de los casos tratados previamente. Además se estima que un 9% de los pacientes con MDR-TB son XDR-TB¹¹.

1.2.2.2 En Europa

Desde el año 2001, la incidencia de tuberculosis ha ido disminuyendo a un ritmo de un 5% por año. Los países fuera de la Unión Europea (UE) y Área Económica Europea (AEE) tienen mayores tasas de tuberculosis y de multirresistencia, mientras que en los países de la UE/AEE los casos se restringen a grupos poblacionales más vulnerables, como extranjeros o presos. En 2012, la incidencia estimada de tuberculosis en la Región Europea fue de 353.000 nuevos casos, lo que equivale a una tasa de 39.4 casos por 100000 habitantes. Esta cifra representa un 4% del total de incidencia de casos nuevos a nivel mundial. El 85% de los casos de la Región Europea ocurrió en 18 países (Armenia, Azerbaiyán, Bielorrusia, Bulgaria, Estonia, Georgia, Kazajstán, Kirguistán, Letonia, Lituania, Moldavia, Rumania, Rusia, Tayikistán, Turquía, Turkmenistán, Ucrania y Uzbekistán), denominados de alta prioridad (Figura 10). El número absoluto de casos nuevos decreció un 12% con respecto al año anterior.

La prevalencia estimada de tuberculosis en el año 2012 en la Región Europea se sitúa en 492000 casos, equivalente a 54.8 casos por 100000 habitantes. Ese mismo año se asocian 35000 muertes por tuberculosis en pacientes VIH negativos. La cifra estimada de casos de multiresistencia (MDR) es de 76.400 casos, de los cuales el 43.7% fueron detectados en 2012. En total se detectaron 339 casos de XDR TB.

Si restringimos los datos a países pertenecientes a la UE/AEE, en 2012 se notificaron 68.423 casos de tuberculosis, un 6% menos que en 2011¹⁰³.

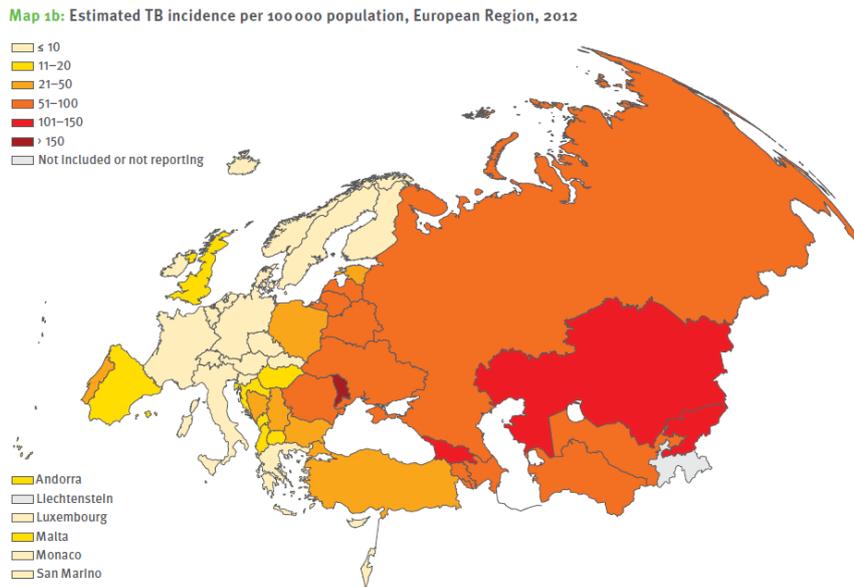


Figura 10: Incidencia estimada de tuberculosis por 100000 habitantes. Región Europea, 2012

Tomado de European Center for Disease Prevention and Control ¹⁰³

1.2.2.3 En España

En España, desde el año 2004 se dispone de información a nivel estatal sobre los casos de tuberculosis de todas las localizaciones en tres categorías de declaración: tuberculosis respiratoria, meningitis tuberculosa, y otras tuberculosis.

A fecha de 4 de noviembre de 2014, la incidencia de la tuberculosis sigue descendiendo en España, debido sobre todo al descenso de la tuberculosis respiratoria. Las tasas de meningitis tuberculosa se mantienen estables los últimos años, y las del resto de localizaciones, tras un aumento continuado hasta el año 2010, comienzan a disminuir, pero no de forma tan acusada como las formas respiratorias. La proporción de casos nacidos fuera de España se mantiene estable los últimos años, cercana al 30%. El descenso del número total de casos de tuberculosis, especialmente desde el año 2008, se ha producido tanto en casos españoles como en extranjeros, si bien en los españoles ha sido más acusado. ¹⁰⁴. Más concretamente, los datos son los siguientes:

En España en el año 2013 se notificaron 5.535 casos de tuberculosis, lo que corresponde a una tasa de incidencia de 11,88 casos por 100.000 habitantes. Esta tasa es un 8,3% inferior a la del año 2012, en que fue de 12,95 casos/100.000 habitantes. Del total de casos, 4.166 corresponden a tuberculosis respiratoria, 73 a meningitis tuberculosa, y 1.296 a tuberculosis

de otras localizaciones. El grupo de edad más afectado en pacientes españoles fue en mayores de 65 años; mientras que en pacientes extranjeros fue de 25-34 años (Figura 11). El número de casos en menores de 15 años fue de 383 (7% del total) en 2013, prácticamente igual al del año 2012. Se dispone de información acerca del estatus VIH en el momento del diagnóstico de tuberculosis en 4.176 casos (75%), de los que 280 (6,7%) eran VIH positivos, y 3.896 (93,3%) negativos. El porcentaje de casos extranjeros respecto al total de casos de tuberculosis varía mucho entre las CCAA. La Rioja (61,2%) Murcia (54,2%), Cataluña (48,5%) y Madrid (43,4%), son las que presentan una mayor proporción de casos nacidos fuera de España, mientras que Asturias (7%), Extremadura (6,1%) y Galicia (5,3%) son las de menor porcentaje de extranjeros. El país de procedencia con mayor porcentaje de casos es Marruecos (23%), seguido a distancia por Pakistán (11%), Rumania (10%), y Bolivia (7%).

De los datos de laboratorio disponibles se obtuvieron 3.637 cultivos positivos, en 769 (21,1%) se aisló *M. tuberculosis*, en 25 (0,7%) *M. bovis*, en 2 (0,05%) *M. africanum* y en 1 (0,03%) *M. caprae*. En el resto (2.840) se señalaba *M. tuberculosis* complex sin especificar.

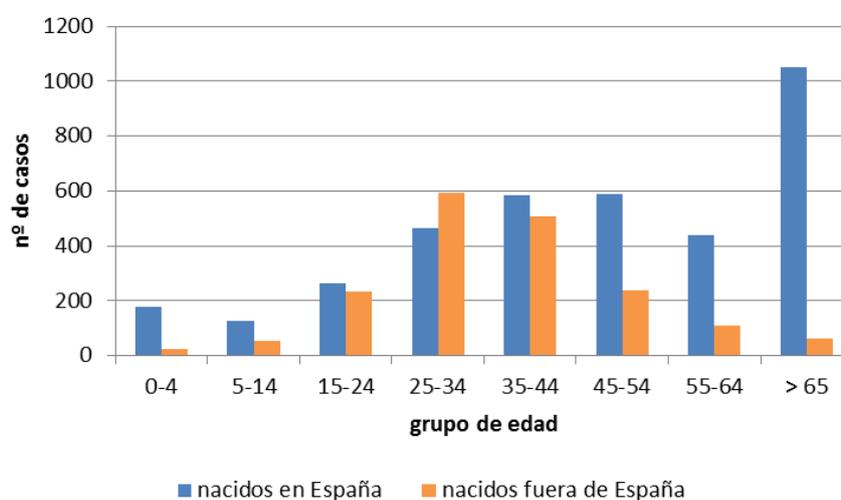


Figura 11: Casos de tuberculosis por grupos de edad y país de nacimiento. España, 2013

Tomado de Centro Nacional de Epidemiología ¹⁰⁴

1.2.3 Poblaciones de riesgo

- Tuberculosis y VIH

El impacto producido por la tuberculosis se ha visto reforzado por la pandemia producida por el VIH, ya que la infección agrava ambas enfermedades ¹⁰⁵. Los pacientes infectados por el VIH no sólo están predispuestos a la reactivación de una infección remota (por compromiso progresivo de la inmunidad celular) sino que también a la progresión rápida de una infección adquirida recientemente. Aproximadamente 35 millones de personas en todo el mundo viven actualmente con VIH/SIDA¹⁰⁶, por tanto el potencial de interacción continuada entre sida y tuberculosis sigue siendo inmenso. Una tercera parte de las personas infectadas por el VIH en todo el mundo están infectadas también con el bacilo tuberculoso, aunque aún no padecen tuberculosis activa. Las personas doblemente infectadas tienen entre 26 y 31 veces más probabilidades de llegar a padecer tuberculosis activa que quienes no están infectadas por el VIH¹¹. Se estima que el riesgo de muerte en personas coinfectadas con *M.tuberculosis* y VIH es el doble con respecto a los pacientes solamente infectados por VIH.

- Tuberculosis e inmigración

En la actualidad, con el aumento de la inmigración y la facilidad para viajar, los países industrializados se están enfrentando a un aumento de sus tasas de tuberculosis, importada por inmigrantes de zonas donde la enfermedad todavía es endémica. Los inmigrantes reproducen en el país de destino la misma situación epidemiológica de sus lugares de origen, y la mantienen dos o tres generaciones después de haberse establecido en el país, ya que tienden a vivir en comunidades relativamente cerradas. Además la situación de la mayoría de ellos es marginal, lo que dificulta el acceso al sistema sanitario y la posible detección y tratamiento; por éste mismo motivo el número de enfermos diagnosticados en los inmigrantes es siempre inferior al real.

- Trasplantes

La tuberculosis es una de las infecciones oportunistas más importantes en los pacientes receptores de un trasplante de órgano sólido^{107,108}. La mayoría de los casos de TB en receptores de trasplantes de órgano sólido se deben a la reactivación de una infección latente tras el inicio del tratamiento inmunosupresor. En todo candidato se

debe evaluar si existen antecedentes de tuberculosis clínica o radiológica y el tratamiento recibido y, en su ausencia, realizar una prueba de tuberculina. En caso de ser ésta positiva, tras descartar enfermedad activa se valorará la realización de quimioprofilaxis¹⁰⁹.

1.2.4 Epidemiología molecular

La caracterización de una cepa concreta de *M.tuberculosis* es importante tanto con fines epidemiológicos como en el seguimiento de la transmisión de una persona a otra, la distinción entre una reinfección exógena y una reactivación endógena en los casos de tuberculosis recurrente y la identificación de contaminación cruzada en los cultivos del laboratorio. La aplicación de estas técnicas en las prácticas habituales de prevención y control de la tuberculosis se consideran actualmente justificadas y parece especialmente útil la existencia de centros de referencia que permitan estudios más extensos que los de un área sanitaria determinada¹¹⁰.

Los métodos usados para tipificación son los siguientes:

- Análisis del polimorfismo de longitud del fragmento de restricción (RFLP): Es la técnica de tipificación más conocida y utilizada. El método se basa en el número variable de copias de la secuencia de inserción IS6110 que presentan las diferentes cepas (de 0 a 25) y en su posición en el genoma. Actualmente se considera el RFLP de la IS6110 como la técnica de referencia¹¹¹. Sin embargo, esta técnica presenta algunas limitaciones, ya que no puede utilizarse si la micobacteria tiene menos de 6 copias de este fragmento en su cromosoma, en cuyo caso es preciso la utilización de otras técnicas^{112,113}. Además, requiere grandes cantidades de ADN (lo que implica la realización de subcultivos que precisan varias semanas), es técnicamente complejo y caro^{111,114}.
- Tipificación de oligonucleótidos espaciadores (Spoligotyping): Entre las técnicas alternativas al RFLP, el spoligotyping es la más extendida. Se basa en la existencia en el genoma de una zona (región DR), que contiene unas secuencias repetitivas de 36 pb, las DR. Entre éstas hay secuencias espaciadoras que son de composición y longitud variable en diferentes cepas. Es una técnica fácil, basada en la PCR y no requiere grandes cantidades del microorganismo. El principal inconveniente de esta técnica es el menor poder de discriminación respecto al RFLP, lo cual impide su utilización como técnica de elección definitiva^{114,115}. Sin embargo, posee una ventaja apreciable sobre la

técnica RFLP ya que permite visualizar con mayor claridad las cepas no idénticas que forman parte de una familia o de un clon grande.

- Análisis de las unidades micobacterianas repetitivas intercaladas (MIRU): También es una técnica de PCR. Se basa en la variabilidad en el número de copias de secuencias repetitivas de 40 a 1.000 pb en 12 zonas intergénicas diferentes del genoma de *M.tuberculosis*. En cada uno de los 12 loci hay de 2 a 8 alelos, lo que da lugar a unos 20 millones de posibles combinaciones de alelos. La técnica es ligeramente más discriminatoria que la de spoligotyping ¹¹⁶. La técnica MIRU puede utilizarse como método de cribado, ya que permite una discriminación adecuada en la mayoría de los casos, y completarse con RFLP de la IS6110 cuando se requiera una discriminación adicional.

1.2.5 Programas de control de la tuberculosis

Con el fin de intentar el control mundial de la tuberculosis, la OMS comenzó a promover una estrategia a nivel internacional, en la que se empezaban a formar los elementos principales de lo que en 1995 se convertiría en el DOTS o terapia acortada directamente observada, en sus siglas inglesas (directly observed therapy short-course). Esta estrategia se basaba en frenar la progresión de la TB de forma global, mediante el diagnóstico precoz de los enfermos y la curación de los casos contagiosos. Posteriormente se desarrolló el “Plan mundial para detener la tuberculosis 2006-2015” en el que se describen las medidas y los fondos necesarios, durante los próximos años, para acelerar los avances en el desarrollo de nuevos instrumentos contra la enfermedad (medios diagnósticos, medicamentos y vacunas) y su aplicación en los países para alcanzar las metas acordadas universalmente para detener la tuberculosis (Organización Mundial de la Salud. Plan Mundial para Detener la Tuberculosis, 2006–2015 / Alianza Alto a la Tuberculosis. 2006).

Por otro lado, para detener la tuberculosis, la OMS ha formulado una nueva estrategia que aprovecha los éxitos del enfoque DOTS y aborda expresamente los principales problemas que plantea la enfermedad. El objetivo es reducir radicalmente la carga mundial de tuberculosis, para 2015 y apoyar el desarrollo de nuevos instrumentos eficaces para prevenir, detectar y tratar la enfermedad.

1.3 Diagnóstico microbiológico

1.3.1 Diagnóstico de la infección tuberculosa

1.3.1.1 Prueba de la tuberculina

La prueba de Mantoux o prueba de la tuberculina consiste en la inyección intradérmica de un PPD (Derivado Proteico Purificado). Este test se basa en la hipersensibilidad que pueden tener las personas que han estado en contacto previo con el bacilo tuberculoso, que han sido vacunadas con *M.bovis* BCG o que han tenido una infección con micobacterias no tuberculosas¹¹⁷⁻¹¹⁹. En la actualidad es uno de los métodos más empleados para el diagnóstico de infección tuberculosa, sin embargo tiene unas importantes limitaciones: sensibilidad subóptima en individuos con disminución de la inmunidad celular, baja especificidad en vacunados con *M.bovis* BCG, efectos *booster*, la necesidad de una técnica estandarizada de administración y lectura y dificultades en la interpretación. Debido a estas limitaciones inherentes a la prueba de la tuberculina, recientemente, se han desarrollado diversos inmunoensayos para optimizar el diagnóstico de la infección tuberculosa.

1.3.1.2 Interferón-Gamma Release Assays (IGRAs)

En estos últimos años han aparecido nuevas técnicas con el objetivo de mejorar el diagnóstico de la infección tuberculosa latente¹²⁰. Estas técnicas detectan el interferón gamma producido por las células T previamente estimuladas (sensibilizadas) por antígenos específicos de *M. tuberculosis* como el ESAT-6 (*Early Secretory Antigen Target-6*) y el CFP-10 (*Culture Filtrate Protein 10*). Existen dos test comercializados: el QFT (QuantiFERON TB Gold o QuantiFERON TB Gold in-Tube, (Cellestis, Australia) y el T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Reino Unido). El QFT Gold In-Tube incorpora, además de los dos antígenos citados, un tercero, el TB7.7. El QFT estimula la sangre total incubada con los antígenos y determina por ELISA la cantidad de interferón. El T-SPOT.TB requiere separar primero las células mononucleares, estimularlas con los antígenos y hacer la lectura por medio de la técnica del ELISPOT en la cual cada punto representa una célula T secretora de gamma-interferón¹²¹⁻¹²³. Entre las características que podrían significar una ventaja de los IGRA en comparación

con la prueba de la tuberculina figuran una mayor especificidad y menos reacciones cruzadas con la vacunación BCG. Además la interpretación es menos subjetiva y se obtienen los resultados de forma rápida. Si bien, estos los test IGRA tienen un mayor coste y requiere un procesamiento de las muestras en el laboratorio¹²⁴.

1.3.2 Diagnóstico de la enfermedad tuberculosa

1.3.2.1 Muestras: selección, recogida, transporte y conservación.

La selección de la muestra dependerá de la sintomatología del paciente y de su enfermedad de base⁶. En caso de sospecha de tuberculosis de localización pulmonar, la muestra más fácil, accesible y rentable es el esputo. Dado que la liberación de bacilos no es continua se recomienda la obtención de tres muestras seriadas en días sucesivos. También se pueden enviar muestras obtenidas por técnicas broncoscópicas y biopsias respiratorias. El jugo gástrico es una buena muestra indicada fundamentalmente en niños o adultos en los que no es posible la obtención de un esputo adecuado.

Cuando se sospecha una infección diseminada por micobacterias, la sangre es la mejor muestra para su detección. Tras la sangre, la médula ósea es la muestra de mayor rendimiento. Otras muestras empleadas para el diagnóstico de enfermedad tuberculosa son: líquidos estériles (cefalorraquídeo, articular, peritoneal, pleural, pericárdico), biopsias de diferentes localizaciones y orina.

1.3.2.2 Pretratamiento de las muestras: descontaminación y concentración

Es necesario recurrir a un pretratamiento adecuado de las muestras clínicas antes de la tinción y siembra en los medios de cultivo con el objeto de eliminar en la medida de lo posible los microorganismos acompañantes y para favorecer la concentración de las micobacterias sobre todo en muestras paucibacilares. El elevado contenido lipídico de la pared de micobacteriana le confiere una mayor resistencia a los ácidos y bases fuertes que pueden ser utilizados como agentes descontaminantes⁵. Existen numerosos protocolos de descontaminación: método de Petroff (hidróxido sódico), Kubica-Krasnow (cisteína y cloruro de benzalconio) y Tacquet y Tison (hidróxido sódico y

laurilsulfato de sodio) entre otros.; pero no existe un método ideal que sirva para todas las muestras clínicas, medios de cultivo y técnicas diagnósticas utilizadas⁶. La combinación N-acetil-L-cisteína más NaOH al 2% es el método de descontaminación-digestión más difundido y el recomendado para la mayoría de los sistemas de cultivo automáticos con medios líquidos.

1.3.2.3 Baciloscopia

Es el procedimiento más simple, barato y rápido para proporcionar al clínico una orientación diagnóstica preliminar. Permite valorar la calidad de las muestras recibidas, identificar los pacientes más contagiosos, y además resulta útil para monitorizar la respuesta de los pacientes al tratamiento antituberculoso. Para que los microorganismos sean detectables deben existir entre 5.000–10.000 bacilos/ml en la muestra. Esto hace que un porcentaje variable (30–50%) de los casos de TB no sean bacilíferos, por lo que una baciloscopia negativa nunca descarta la enfermedad. Los métodos más utilizados para determinar la acido alcohol resistencia (AAR) de las micobacterias son⁶:

- Las tinciones basadas en la utilización de fucsina fenicada como colorante primario (Ziehl- Neelsen (Figura 12), Kinyoun).
- Métodos que utilizan como colorante primario determinados fluorocromos (auramina o auramina rodamina) donde los microorganismos que son AAR, bajo la luz ultravioleta, aparecen fluorescentes de color amarillo o naranja dependiendo del filtro empleado (Figura 12).

La microscopía presenta una sensibilidad en torno al 60% comparada con el cultivo¹²⁵. La especificidad del examen directo de la muestra para determinar el género *Mycobacterium* es bastante elevada; pero, no hay que olvidar que existen otras bacterias que pueden presentar diferentes grados de AAR como son: *Nocardia spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Tsukamurella spp.*, *Gordonia spp.* y *Legionella micdadei*. Un aspecto importante del informe es la cantidad de BAAR observados. Para tratar de sistematizar la emisión de resultados se han propuesto diferentes esquemas que se resumen en la Tabla 5.

| Informe | Ziehl-Neelsen (× 1.000) | Tinción fluorescente (× 250) | Tinción fluorescente (× 450) |
|------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Negativo | 0 | 0 | 0 |
| Dudoso (repetir) | 1-2/300 campos (3 barridos) | 1-2/30 campos (1 barrido) | 1-2/70 campos (1,5 barridos) |
| Positivo 1 + | 1-9/100 campos (1 barrido) | 1-9/10 campos | 2-18/50 campos (1 barrido) |
| Positivo 2 + | 1-9/10 campos | 1-9/campo | 4-36/10 campos |
| Positivo 3 + | 1-9/campo | 10-90/campo | 4-36/campo |
| Positivo 4 + | > 9/campo | > 90/campo | > 36/campo |

Tabla 5: Interpretación e informe de la microscopia (baciloscopia) para la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR)

Tomado de González-Martín et al.⁷⁵

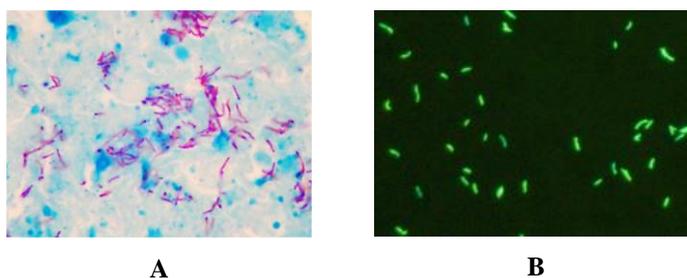


Figura 12: Tinciones para visualización de micobacterias

A: Tinción de Ziehl-Neelsen de *Mycobacterium spp.*;

B: Tinción de auramina de *Mycobacterium spp.*

1.3.2.4 Medios de cultivo

El cultivo es considerado como la técnica de referencia para detectar micobacterias en muestras clínicas, y posee mucha mayor sensibilidad que la tinción, siendo capaz de detectar entre 10-100 bacterias/ml de muestra⁷⁵. Además permite el aislamiento del agente causal, la identificación de la especie, los posteriores estudios de sensibilidad frente a los antimicrobianos, así como la monitorización del tratamiento y curación del paciente. Para el aislamiento de las micobacterias se utilizan tanto medios sólidos como líquidos.

1. Los medios sólidos pueden ser de formulación compleja, con base de huevo, como el medio de Löwenstein-Jensen, o semisintéticos, con base de agar, como los medios de Middlebrook 7H10 y 7H11. La ventaja fundamental de estos medios, frente a su lentitud, es que permiten la visualización morfológica de las colonias como un primer paso en la identificación presuntiva, así como la posibilidad de detectar cultivos no puros¹²⁶.

2. Los medios líquidos se utilizan en frascos cerrados herméticamente y suelen basarse en formulaciones parecidas al medio Middlebrook 7H9 suplementado con diversos factores de crecimiento y mezclas de antibióticos. En general, son medios muy enriquecidos que recuperan un mayor número de micobacterias y más rápidamente que los medios sólidos. Tras ser inoculados, se incuban en estufas permitiendo su lectura bien de forma manual o de forma automática⁴.

Los sistemas de detección automática o semiautomática han mejorado la recuperación de todo tipo de micobacterias, disminuyendo considerablemente el tiempo de detección de las mismas. Monitorizan el crecimiento micobacteriano detectando la producción de CO₂ o el consumo de O₂, a través de indicadores radiométricos, fluorométricos o colorimétricos. El sistema BACTEC con tubo de indicador de crecimiento micobacteriano MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube, Becton Dickinson Microbiology Systems, EEUU), que detecta crecimiento mediante método fluorométrico, es el más utilizado.

Como regla general, el tiempo de incubación debe ser prolongado. Aunque no hay un acuerdo unánime, el periodo de 6-8 semanas parece ser el más adecuado⁶.

1.3.2.5 Técnicas de identificación de micobacterias

1.3.2.5.1 Identificación fenotípica

Las técnicas de identificación fenotípica se siguen usando para la caracterización de los aislamientos⁴. Entre ellas cabe citar la observación de diferencias microscópicas (orienta de forma presuntiva la identificación de alguna especie); la velocidad y temperatura de crecimiento; las características de la colonia (morfología, producción de pigmento) y las pruebas bioquímicas (catalasa semicuantitativa y termotolerancia de la misma, hidrólisis del Tween 80, ureasa, producción de niacina, reducción de nitratos, actividad fosfatasa ácida, actividad arilsulfatasa, actividad pirazinamidasa, actividad α -esterasa, resistencia a la isoniacida).

1.3.2.5.2 Identificación cromatográfica

El análisis cualitativo de la composición lipídica de la pared de las micobacterias permite diferenciar especies o grupos de especies. Existen tres tipos de técnicas cromatográficas utilizadas en la identificación: cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de gases (GLC) y cromatografía líquida de alta presión (HPLC). En todas ellas se obtiene la muestra adecuada a partir de la cepa, después de una extracción y separación de los lípidos del resto de componentes celulares y de un tratamiento que posibilite su migración o volatilidad. En general son técnicas que permiten la identificación de especie, con sus limitaciones, en un periodo razonablemente rápido (1-2 días)⁶.

1.3.2.5.3 Identificación molecular

Las técnicas genéticas poseen una elevada eficacia en la identificación del complejo *M.tuberculosis* y permiten la identificación de la mayoría de especies que se aíslan a partir de muestras clínicas⁷⁵. Durante los últimos años se ha utilizado con éxito la identificación del *M. tuberculosis* mediante un método comercial basado en sondas de hibridación quimioluminiscentes aunque recientemente se están difundiendo diversos métodos basados en hibridación con sondas inmovilizadas en tiras de nitrocelulosa y revelado enzimático capaces de identificar de 10-15 especies distintas con una especificidad cercana al 100%¹²⁷. Durante la última década se han desarrollado diferentes métodos moleculares, especialmente de amplificación genómica, para la detección e identificación del complejo *M. tuberculosis* directamente en muestras clínicas. En virtud de las diferentes dianas (*hsp65*, regiones de la subunidad ribosómica 16S, región intergenética 16S-23S ribosomal, elementos de inserción), métodos de amplificación y detección utilizados existen en la actualidad múltiples sistemas comerciales y caseros. La mayoría de los estudios se han aplicado a la tuberculosis pulmonar, utilizando la técnica de PCR y la *IS6110* como diana genética. Aunque se han descrito aislamientos carentes de esta secuencia, en general su rendimiento ha sido superior al de otras dianas propuestas. En las mejores condiciones de ensayo la sensibilidad es menor que el cultivo y está relacionada con la carga bacteriana, de forma que en muestras con baciloscopia positiva oscila entre 90- 100% mientras que en aquellas con baciloscopia negativa se sitúa entre 60-70%¹²⁸.

La amplificación de ácidos nucleicos complementa, pero no reemplaza el juicio clínico, las tinciones de ácido-alcohol resistencia y el cultivo en el diagnóstico de la tuberculosis. Cuando el grado de sospecha clínica de tuberculosis pulmonar es alto pero la baciloscopia es negativa, una prueba de amplificación de ácidos nucleicos positiva tiene un valor predictivo alto de tuberculosis y permite instaurar precozmente el tratamiento. Estas técnicas también son útiles para tuberculosis extrapulmonar usando muestras no respiratorias como líquido pleural, orina, LCR o tejidos, pudiendo ayudar a su diagnóstico. No obstante cabe señalar que las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos no pueden distinguir entre microorganismos viables y los muertos y no se deben de usar para monitorizar la respuesta al tratamiento.

1.3.2.5.4 Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF)

La espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF se trata de un método que, mediante la aplicación de energía laser a una muestra embebida en una matriz, consigue vaporizar e ionizar esa matriz, que eventualmente puede arrastrar en esa vaporización e ionizar a su vez a una muestra representativa de las proteínas contenidas en la muestra. Esas proteínas ionizadas son sometidas a aceleración en un campo eléctrico y a una migración a través de un tubo de vacío hasta un detector. El tiempo que transcurre desde su vaporización/ionización hasta su detección dependerá del cociente masa/carga (m/z) de esa proteína, y ese cociente m/z permitirá determinar la masa exacta de la proteína de manera extremadamente fiable. En el caso de los microorganismos, se genera de esta forma un perfil de proteínas con diferentes cocientes m/z , que se comporta como una huella dactilar, permitiendo identificar con gran fiabilidad al microorganismo a partir de dicho perfil¹²⁹. Se han desarrollado sistemas comerciales con bases de datos y programas de manejo sencillo, utilizándose la EM MALDI-TOF como un método rápido y fiable para la identificación bacteriana. Se han realizado algunos estudios¹³⁰⁻¹³² sobre la utilidad de MALDI TOF en la identificación de micobacterias obteniendo buenos resultados, sin embargo las cepas pertenecientes a especies del complejo tuberculosis se identificaron solamente a nivel de complejo, siendo imposible su diferenciación a nivel de especie^{132,133}. Del mismo modo es incapaz de discriminar entre especies muy próximas como *M. abscessus*/*M. massiliense*, *M. mucogenicum*/*M.*

phocaicum, y *M. chimaera*/*M. intracellulare*, *M. abscessus*/*M. chelonae* y entre especies pertenecientes a complejos como *M. avium* complex¹³⁴.

1.3.2.6 Técnicas de estudio de sensibilidad antibiótica

Los métodos fenotípicos convencionales pueden basarse en medios sólidos (método de la ratio de resistencia, método de las concentraciones absolutas y método de las proporciones críticas) o líquidos (con ventajas de acortamiento tiempo de incubación, la estandarización del inóculo y la lectura automatizada o semiautomatizada). Con respecto a los métodos fenotípicos no convencionales, uno de los más conocidos es la detección de actividad ATP de la micobacteria en presencia de antibiótico mediante bioluminiscencia; otros son los basados en técnicas colorimétricas o de citometría de flujo. Los métodos basados en la utilización de fagos han adquirido mayor relieve en los últimos años.

Por su parte, los métodos genotípicos se basan en la detección de las alteraciones genéticas que condicionan resistencia a los diferentes fármacos. Pueden detectarse estas alteraciones con gran rapidez, incluso directamente en las muestras clínicas. Sin embargo su principal inconveniente es que, con excepción de la rifampicina, no se conocen las alteraciones genéticas que causan entre el 20 y el 40% de las resistencias a la mayoría de los fármacos de primera línea.

- a) Resistencia a la isoniacida. Está asociada fundamentalmente a dos genes: el gen *katG* y el gen *inhA*. El primero codifica el enzima catalasaperoxidasa, implicada en la transformación de la isoniacida en su compuesto activo. El gen *inhA* codifica la enzima enoil ACP reductasa que participa en la síntesis de la pared bacteriana. Otros genes, como *kasA*, *furA*, y *ndh*, también se han relacionado con la resistencia a la isoniacida, pero su papel es incierto.
- b) Resistencia a la rifampicina. Esta se encuentra, prácticamente en todos los casos, relacionada con alteraciones en el gen *rpoB*, que codifica la subunidad beta de la ARN polimerasa, causando interferencias en la transcripción.
- c) Resistencia al etambutol. Está causada por alteraciones del enzima arabinosil transferasa, que interviene en la síntesis de la pared celular. En la mayoría de casos se debe a cambios en los tres genes del operón *emb*.

- d) Resistencia a la estreptomina. Las alteraciones responsables se han localizado en los genes *rrs* y *rpsL*, relacionados con la subunidad ribosómica 30S y la síntesis proteica.
- e) Resistencia a la pirazinamida. Se asocia, sobre todo, a mutaciones del gen *pncA*, que codifica la pirazinamidasa que transforma el antibiótico en el principio activo.

1.4 Tratamiento y prevención de la tuberculosis

1.4.1 Objetivos de la quimioterapia

El tratamiento correcto es la mejor medida de control de la tuberculosis. Los objetivos fundamentales de la quimioterapia de la tuberculosis deben ser tres¹³⁵:

1. Eliminar rápidamente los bacilos tuberculosos que están en multiplicación activa, con las drogas más bactericidas: isoniazida y rifampicina.
2. Prevenir el desarrollo de resistencia bacteriana con asociaciones de drogas, especialmente isoniazida, rifampicina y etambutol.
3. Esterilizar las lesiones tuberculosas con los fármacos más esterilizantes: rifampicina, pirazinamida y en menor grado isoniazida, para prevenir recaídas.

La base para conseguir éstos objetivos radica en la utilización de tratamientos asociados, prolongados y supervisados.

1.4.2 Esquemas de tratamiento actuales

Para el caso de pacientes que no han sido tratados previamente se debe utilizar una combinación de fármacos antituberculosos de primera línea durante un tiempo suficiente, administrados simultáneamente y en dosis única.

La mejor asociación que se ha encontrado hasta ahora es la que utiliza 2 meses de INH, RIF y Z, seguida de 4 meses de INH y RIF. Esta pauta tiene un alto nivel bactericida y esterilizante, presenta escaso número de fracasos (inferir al 1%) y de recaídas (2-4%) y tiene pocos efectos adversos¹³⁵. Este esquema sería en una situación ideal, pero lamentablemente debido al mal uso de los fármacos y otros factores es necesario añadir otra droga para prevenir el desarrollo de resistencia a RIF, sobre todo en presencia de INH. Se ha elegido el etambutol (E) ya que ha demostrado tener poca resistencia

primaria. Así actualmente, en todos los casos nuevos de tuberculosis, se incluye E como cuarto fármaco en la primera fase. En zonas con alto nivel de resistencia inicial a INH y en ausencia de test de susceptibilidad, se recomienda continuar con E en la segunda fase del tratamiento. Este es el esquema que recomienda la OMS para nuevos enfermos de tuberculosis¹³⁶.

Todo programa deberá incluir un subprograma de tratamiento directamente observado (TDO) para aplicar a los pacientes en los que, por sus características personales o sociales, se les sospechen dificultades para adherirse al tratamiento (indigentes, presos, toxicómanos), así como a aquéllos con tuberculosis multirresistente y/o extremadamente resistente (MDR/XDR)¹³⁷.

1.4.3 Tuberculosis resistente a drogas

La resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* puede ser primaria o secundaria también llamada adquirida. La primaria se define como aquella en la que se presentan cepas aisladas en pacientes que nunca antes han recibido tratamiento antituberculoso. La secundaria es la debida a una quimioterapia incorrecta provocada por la utilización de un esquema terapéutico inicial erróneo, una indicación inadecuada de tratamiento de infección tuberculosa (quimioprofilaxis) al no descartar enfermedad activa, o un incumplimiento del tratamiento. Es importante recordar que *M.bovis* presenta una resistencia intrínseca a la pirazinamina debido a mutaciones en la secuencia genética de *pncA*, y por ello no se recomienda el uso de este fármaco para el tratamiento de la tuberculosis cuando se identifica esta especie del complejo.

Se denomina tuberculosis multirresistente (MDR TB) a la causada por un organismo resistente a por lo menos dos medicamentos de primera línea, la isoniazida y la rifampicina. La tuberculosis extremadamente resistente (XDR TB) es un tipo de tuberculosis MDR relativamente poco común. Se define como una tuberculosis resistente a la isoniazida y a la rifampicina, así como a todas las fluoroquinolonas y a por lo menos uno de tres medicamentos inyectables de segunda línea (p. ej., amicacina, kanamicina o capreomicina). En la Tabla 6 se muestran los grupos de drogas para tratar MDR TB según la OMS¹³⁶.

| Grupo | Antibióticos (Abreviatura) |
|---|---|
| Grupo 1. Agentes orales de primera línea | Pirazinamida (Z) Etambutol (E) Rifabutina (Rfb) |
| Grupo 2: Agentes inyectables | Kanamicina (Km) Amikacina (Am) Capreomicina (Cm) Estreptomicina (S) |
| Grupo 3. Fluorquinolonas | Levofloxacino (Lfx) Moxifloxacino (Mfx) Ofloxacino (Ofx) |
| Grupo 4. Agentes bacteriostáticos orales de segunda línea | Ácido para-aminosalicílico (PAS) Cicloserina (Cs) Terizidona (Trd) Etionamida (Eto) Protionamida (Pto) |
| Grupo 5. Agentes con dudo actividad en el tratamiento de la tuberculosis | Clofazimina (Cfz) Linezolid (Lzd) Amoxicilina/clavulánico (Amx/Clv) Tioacetazona (Thz) Imipenem/cilastatina (Ipm/Cln) Isoniazida altas dosis Claritromicina (Clr) |

Tabla 6: Grupos de drogas para tratar MDR TB . Tomado de World Health Organization ¹³⁶

Los antituberculosos de segunda línea son menos efectivos y/o más tóxicos que los de primera línea. Aquí se incluyen etionamida, cicloserina, amikacina, kanamicina, capreomicina, tiacetazona, ácido para-aminosalicílico (PAS). Otras drogas como amoxicilina-ácido clavulánico, claritromicina, clofazamina y linezolid se consideran de tercera línea. Son menos activos aún que los de segunda línea. Se utilizan como adyuvantes en el tratamiento de XDR-TB⁶⁹.

Recientemente se están desarrollando nuevos fármacos, como los análogos sintéticos de la espectinomina ¹³⁸, que mejoran la tolerancia y demuestran una gran eficacia al bloquear una bomba de eflujo (Rv1258c). Otros ejemplos de esto son: Q203 (imidazopiridina que actúa a nivel del complejo citocromo bc), bedaquiline (diarilquinolona que actúa a nivel de la síntesis de ATP) o SQ109 (dietilamina que actúa a nivel de la síntesis de la pared celular). Todos ellos y otros más se encuentran en diferentes fases de desarrollo tanto preclínico como clínicos de fase 1, 2 o 3¹³⁹.

1.4.4 Quimioprofilaxis

La quimioprofilaxis primaria suministra protección temporal al contacto de un enfermo con una forma de enfermedad contagiosa con la finalidad que no se infecte ni adquiera la enfermedad. Por tanto se administrará durante el periodo ventana durante el que la prueba de la tuberculina puede aún hacerse positiva tras una primera prueba de la tuberculina con resultado negativo.

1.4.5 Vacuna BCG

La vacuna BCG se utilizó por primera vez para inmunizar a seres humanos en 1921. Poco tiempo después de su introducción en el Programa Ampliado de Inmunización de la OMS en 1974, se alcanzaron tasas de cobertura de vacunación superiores al 80% en países en los que la tuberculosis es endémica. Actualmente, se administra la vacuna BCG a unos 100 millones de niños cada año. Todas las cepas vacunales actuales derivan del aislado original de *M. bovis* que Calmette y Guérin sometieron a más de 230 pases en medios de cultivo con bilis de buey y patata glicerizada durante el periodo de 13 años de 1909 a 1921 hasta conseguir su atenuación¹⁷.

Se ha documentado el efecto protector en niños de la vacuna BCG contra la meningitis tuberculosa y la tuberculosis diseminada. Sin embargo no evita la infección primaria ni evita la reactivación de la infección pulmonar latente. Los estudios para evaluar la eficacia de protección contra la tuberculosis pulmonar del BCG tienen resultados contradictorios. Generalmente, se alcanzaron tasas de protección más altas (60–80%) en América del Norte y en el norte de Europa, mientras que los estudios realizados en regiones tropicales mostraban habitualmente una protección baja o nula^{140,141}.

Según la OMS, la vacuna BCG está indicada para todos los lactantes que viven en zonas con endemicidad muy alta de tuberculosis, para los lactantes y niños que viven en zonas de endemicidad baja, pero con riesgo particular de exposición a la tuberculosis y para personas expuestas a *M. tuberculosis* multirresistente.

Sin embargo, vacunación BCG está contraindicada para personas con inmunodeficiencias, enfermos que reciben tratamiento inmunodepresor (corticoesteroides, agentes alquilantes, antimetabolitos, radiación) y durante el embarazo.

▶JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La tuberculosis continúa siendo una de las causas más importantes de enfermedad y muerte en muchos países y un importante problema de salud pública en todo el mundo. Durante más de un siglo la baciloscopia, junto con el cultivo, han sido las únicas herramientas disponibles para su diagnóstico, pero la baja sensibilidad de la tinción y la lentitud del cultivo han limitado su utilidad hoy en día. Con la introducción de técnicas de biología molecular en los últimos años, el diagnóstico se puede realizar de una forma más rápida y eficaz, habiendo pasado desde diseños desarrollados en los propios laboratorios, hasta pruebas comercializadas con las últimas tecnologías, que muestran una alta sensibilidad y especificidad. El diagnóstico precoz de la tuberculosis es esencial para el control de la enfermedad, con el fin de interrumpir la cadena de transmisión y poder administrar una correcta terapia antibiótica.

En este entorno, la empresa Vircell (Granada), hace unos años desarrolló kits de PCR Speed-Oligo®, para el diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas, incluyendo las micobacterias. Se basan en la combinación de un método de amplificación por PCR con un procedimiento de detección simple en un dipstick (tira reactiva) que no requiere larga preparación postamplificación o equipos exclusivos.

Por todo esto nos propusimos evaluar la técnica comercial Speed Oligo® Direct *Mycobacterium tuberculosis* (SO-MTBC) para el diagnóstico de tuberculosis en muestras respiratorias y diseñar un prototipo de kit con el mismo formato Speed Oligo®, que permita diferenciar a los miembros del complejo *M.tuberculosis* (incluye siete especies patógenas) con mayor interés clínico a partir de aislados de una forma sencilla, rápida y accesible, dado que esta diferenciación puede aportar numerosos avances a nivel epidemiológico y aumentar las expectativas de mejora del tratamiento. Además, debido a la importancia del conocimiento de la clínica y epidemiología de la enfermedad, se estudiaron en este trabajo las características de los pacientes con tuberculosis en el Área sanitaria Norte de Granada.

En este trabajo se pretenden los siguientes objetivos generales:

- Evaluar el ensayo Speed Oligo® Direct *Mycobacterium tuberculosis* (SO-DMT) para la detección directa de micobacterias en muestras clínicas respiratorias.

Justificación y objetivos

- Diseñar un kit con formato Speed-Oligo® (SO-MTBC) para la identificación de los siete miembros del complejo *M.tuberculosis* con interés clínico. Con los siguientes objetivos específicos:
 - Establecer las zonas del genoma de *M.tuberculosis* que están delecionadas (RD) en otras especies del complejo y que pueden facilitar la diferenciación de los miembros del complejo *M.tuberculosis*.
 - Diseñar los oligonucleótidos necesarios para la correcta amplificación de dichas zonas (RDs) mediante PCR.
 - Diseñar las sondas adecuadas para la visualización del producto amplificado en una tira de nitrocelulosa, mediante la técnica Speed-oligo®.
 - Optimizar la técnica de amplificación de ácidos nucleicos multiplex, adaptando las concentraciones y cantidades de reactivos que intervienen en la reacción y condiciones en las que se produce.
- Validar el SO-MTBC utilizando cepas del complejo *M.tuberculosis* de pacientes diagnosticados en el hospital Universitario Virgen de las Nieves (HUVN) en los años 2011-2014 en comparación con la técnica comercial GenoType®MTBC (Hain Lifescience).
- Describir las características clínico-epidemiológicas de los casos de tuberculosis diagnosticados en el Área Norte de Granada desde el año 2011 hasta 2014.

► MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Evaluación del Speed Oligo® Direct *Mycobacterium tuberculosis* (SO-DMT) para la detección directa de micobacterias en muestras clínicas respiratorias

Se analizaron 249 muestras respiratorias de 199 pacientes con sospecha de tuberculosis recibidas en el laboratorio entre los meses de abril a junio de 2011. Los resultados obtenidos con SO-DMT se compararon con el cultivo en medio líquido BACTEC MGIT (según se describe posteriormente en el apartado 3.4.3.) La identificación de las micobacterias aisladas se realizó con sondas de hibridación y con el ensayo GenoType CM/AS (Hain Lifescience, Nehren, Alemania). Para el procedimiento de la técnica SO-DMT se siguieron las indicaciones del fabricante:

- Extracción de ADN: Se transfiere 200 µl de la muestra respiratoria descontaminada, neutralizada y concentrada a un tubo eppendorf y se centrifuga durante 10 minutos a 12.000 g. Tras retirar el sobrenadante, se resuspende el pellet con 300µl de vircell lysis solution. Se vuelve a centrifugar durante 10 minutos a 12.000 g y finalmente se retira el sobrenadante y se resuspende el pellet con 100µl de vircell lysis solution. Este vial introduce en un termobloque durante 20 minutos a 95°C para inactivar el microorganismo. A continuación se agita con un homogeneizador celular a 3000 rpm durante 5 minutos y se conserva el ADN a 2-8°C hasta su uso en la reacción de amplificación.
- Condiciones de PCR: El líofilo que contiene los componentes de la mezcla de reactivos necesarios se reconstituye con 150 µl de Vircell PCR Mix reconstitution solution. Se adiciona 15 µl de PCR mix a cada tubo y 10 µl de cada muestra extraída. Las condiciones de PCR se detallan en la Tabla 7:

| T ^a (°C) | Tiempo |
|---------------------|--------|
| 92 | 1 min |
| 92* | 20 s |
| 55* | 20 s |
| 72* | 20 s |
| 72 | 1 min |
| 4 | ∞ |

Tabla 7: Condiciones de la PCR de SO-DMT

* 40 ciclos

- Detección en tira de nitrocelulosa: Se prepara un tubo eppendorf por cada muestra con 35 µl de vircell running solution y se precalienta en un termobloque a 55 °C durante 2-5 minutos. Tras desnaturalizar el producto de PCR (1-2 minutos a 95°C) se adiciona 10 µl al tubo que permanece en el termobloque, se introduce inmediatamente la tira de detección y se incuba a 55°C durante 5-15 minutos. Finalmente se saca la tira para interpretar los resultados. El test incluye tres líneas de lectura: la línea de control de producto que siempre debe ser positiva; una línea control de la amplificación de PCR y la línea test que incluye dos bandas diferentes, una correspondiente a un gen específico para el género *Mycobacterium* y una banda correspondiente a una secuencia específica del complejo *M.tuberculosis*.

3.2 Diseño del Speed Oligo® *Mycobacterium tuberculosis* complex (SO-MTBC) para diferenciación de especies del complejo *M.tuberculosis*

3.2.1 Elección de regiones de delección (RD) y propuesta de algoritmos para la diferenciación del complejo *M.tuberculosis* con SO-MTBC

El primer paso para el diseño de la técnica es conocer las regiones del genoma de las micobacterias del complejo *M.tuberculosis* que nos permitan su diferenciación. Para ello se realizó una búsqueda bibliográfica y basándonos en otros autores^{57,142-144} se

propusieron algunos posibles algoritmos, (Tabla 8) utilizando el menor número de zonas de diferenciación posibles con el objeto de facilitar el diseño de la técnica y evitar utilizar demasiados reactivos que podrían crear interferencias en la reacción de PCR.

Propuesta 1:

| Micobacteria | <i>M. tuberculosis</i> | <i>M. bovis</i> | <i>M. bovis BCG</i> | <i>M. africanum</i> | <i>M. microti</i> | <i>M. caprae</i> | <i>M. canettii</i> |
|-------------------|------------------------|-----------------|---------------------|---------------------|-------------------|------------------|--------------------|
| Región ADN | | | | | | | |
| RD1 | + | + | - | + | - | + | + |
| RD4 | + | - | - | + | + | + | + |
| RD9 | + | - | - | - | - | - | + |
| RD12 | + | - | - | + | + | - | - |
| ITS | + | + | + | + | + | + | + |

Propuesta 2:

| Micobacteria | <i>M. tuberculosis</i> | <i>M. bovis</i> | <i>M. bovis BCG</i> | <i>M. africanum</i> | <i>M. microti</i> | <i>M. caprae</i> | <i>M. canettii</i> |
|-------------------|------------------------|-----------------|---------------------|---------------------|-------------------|------------------|--------------------|
| Región ADN | | | | | | | |
| RD3 | + | + | - | - | - | nd | - |
| RD5/6 | + | - | - | + | - | + | + |
| RD9 | + | - | - | - | - | - | + |
| RD13 | + | - | - | + | + | - | + |
| ITS | + | + | + | + | + | + | + |

Tabla 8: Algoritmos propuestos para la diferenciación del complejo *M.tuberculosis*

(+): Región presente, (-): Región ausente (nd): Datos no disponibles (ITS): internal transcribed spacer

El segmento ITS es una zona común a todas las micobacterias pertenecientes al complejo *M.tuberculosis* que se introdujo en el diseño de la técnica con objeto de asegurar que la cepa estudiada pertenezca al complejo *M.tuberculosis*. En caso de testar una cepa de micobacteria no tuberculosa, no amplificaría esta región; lo cual serviría para diferenciar la presencia de *M.bovis* BCG de la presencia de una micobacteria no tuberculosa o cualquier otra bacteria contaminante.

3.2.2 Diseño de cebadores para la amplificación de las RD seleccionadas en el SO-MTBC

Una vez identificadas las RD que pueden diferenciar a los miembros del complejo, se hizo una búsqueda bibliográfica con objeto de identificar los genes ubicados en dichas regiones^{56,61,66}. Así obtuvimos la secuencia genética de la región de interés en la base de datos online Tuberculist (<http://tuberculist.epfl.ch/>). Utilizando el programa informático Clone Manager Suite 7 (Sci-Ed Software) se diseñaron cebadores con características compatibles con la técnica Speed Oligo® que garantizaran las siguientes condiciones: el producto generado en la PCR fuera en torno a 150pb, la temperatura de melting en torno a 60° y el tamaño de primer estuviera entre 18-24 pb. Las características de cada oligonucleótido (contenido en GC, longitud) y del producto generado (longitud, composición de bases, temperatura *melting*) en cada caso se recogieron de éste mismo programa. Así para cada región seleccionada se propusieron al menos dos o tres parejas de cebadores (Tabla 9). Una vez elegidos los cebadores se confirmó la presencia o ausencia del producto generado por ellos en las distintas especies del complejo mediante el uso online de BLASTn (NCBI).

| RD | Nombre | Secuencia | % GC | longitud | Diana |
|------|---------|------------------------------|------|----------|---------|
| RD1 | RD1.1F | 5'CTTCTGACCCGCTAATAC 3' | 50 | 18 | esat-6 |
| | RD1.1R | 5'CAAGGAGGGAATGAATGG 3' | 50 | 18 | |
| | RD1.2F | 5'TTCGTCAGGCCGGCGTCCAATAC 3' | 23 | 61 | Rv3874 |
| | RD1.2R | 5'GGCCTCGATACCCGCGAAATTCC 3' | 23 | 61 | |
| RD4 | RD4.1F | 5'CAACGCCACGAAGTAAGC 3' | 55 | 28 | Rv1508c |
| | RD4.1R | 5'GTCATATCTCCC GCCATCTG 3' | 55 | 20 | |
| | RD4.2F | 5'TGGTCCATGTCGATTGAGTG 3' | 50 | 20 | Rv1508c |
| | RD4.2R | 5'GAGTCCGAGCTCACATCC 3' | 61 | 18 | |
| | RD4.3F | 5'CGAGGTCTATTTCTGCTG 3' | 50 | 18 | Rv1509 |
| | RD4.3R | 5'TATGGTGCAGGATTACGA 3' | 44 | 18 | |
| RD9 | RD9.1F | 5'CCACGGCTGCGATTATTG 3' | 56 | 18 | Rv2074 |
| | RD9.1R | 5'CAGATGGCGTTCGAAAG 3' | 56 | 18 | |
| | RD9.2F | 5'CGATGGTCAACACCACTAC 3' | 53 | 19 | Rv2074 |
| | RD9.2R | 5'GGTCGAAGGTGAAACCTAC 3' | 53 | 19 | |
| RD12 | RD12.1F | 5'GACAAGCACCTCGATTCC 3' | 56 | 18 | Rv3121 |
| | RD12.1R | 5'GGACAGCACTCCCTTTAC 3' | 56 | 18 | |
| | RD12.2F | 5'TGTTGAGAACCCGTTTCG 3' | 50 | 18 | Rv3120/ |
| | RD12.2R | 5'GGGAACCTCTCACAGATTG 3' | 50 | 20 | Rv3121 |
| | RD12.3F | 5'ACGTGCGTGACCACAATG 3' | 56 | 18 | Rv3119 |
| | RD12.3R | 5'TCGGCCTTGTCTTCACACC 3' | 58 | 19 | |
| ITS | ITS.F | 5'AACAAAGTTGGCCACCAACAC 3' | 48 | 21 | ITS |
| | ITS.R | 5'GATGCTCGCAACCACTATCC 3' | 55 | 20 | |

Tabla 9: Parejas de cebadores propuestos para cada región RD (RD1, RD4, RD9, RD12) e ITS de acuerdo con el algoritmo n°1

3.2.3 Diseño de sondas para detectar los productos amplificados en el SO-MTBC

Las reacciones de amplificación que se produjeron utilizando los cebadores previamente señalados en la Tabla 9 generaron los productos de amplificación o amplicones. Para proceder a la visualización de éstos en una tira de nitrocelulosa (formato Speed Oligo®) se necesitan dos sondas (una de captura y otra de detección) por cada producto de amplificación. Las sondas fueron diseñadas cuando se eligieron los cebadores definitivos para formar parte de la PCR multiplex (detallados más adelante en la Tabla 17 de resultados). Para ello, a partir de cada amplicón se propusieron varias sondas teniendo en cuenta que la longitud ideal era de 18 a 25 pb y con una proporción G+C cercana al 55-60%. Posteriormente se comprobó que fueran compatibles entre sí mediante el análisis de heterodímeros en la web IDT (Integrated DNA Technologies) con la herramienta online Oligo Analyzer (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). El procedimiento llevado a cabo hasta este momento se puede resumir en la Figura 13:

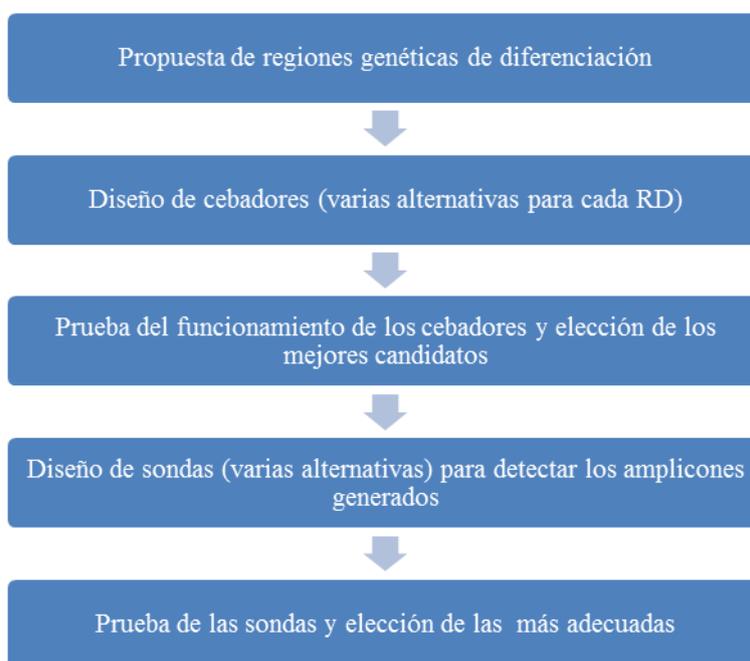


Figura 13: Esquema del procedimiento llevado a cabo para el diseño de la técnica SO-MTBC

3.2.4 Montaje de las tiras de nitrocelulosa para la visualización de los resultados del SO-MTBC

Para el montaje de las tiras reactivas son necesarios el pad de muestra y el pad de absorción (Figura 14). Se prepara una mezcla (de concentración y volumen determinados) de las sondas de captura unidas a oro coloidal y se secan en el pad de muestra. Este oro va a ser el responsable de la generación de una banda coloreada que nos indica la presencia de producto amplificado. Por otro lado se inmovilizan cada una de las sondas de detección a la tira de nitrocelulosa. A continuación se procede al ensamblaje de las tiras.

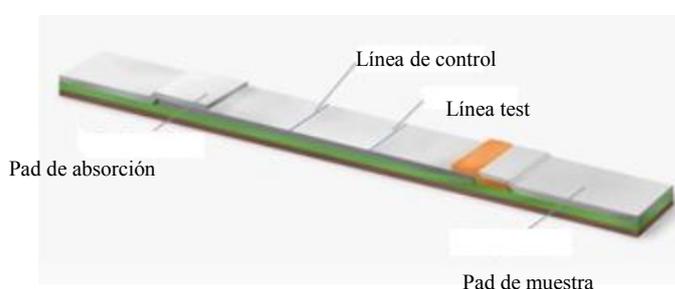


Figura 14: Esquema de los diferentes pad en la tira reactiva

3.2.5 Cepario de *Mycobacterium tuberculosis* complex utilizado para el diseño del SO-MTBC

Se utilizaron cepas de colección de las especies de *M.tuberculosis* NC13144, *M.bovis* NC10772, *M.bovis* BCG NC05692, *M.africanum* (aislado clínico), *M.caprae* (aislado clínico) y *M.microti* NC08710 (una cepa por cada especie citada). Los aislados clínicos de *M.africanum* y *M.caprae* utilizados para el diseño del SO-MTBC fueron identificados previamente con el kit GenoType® MTBC (Hain) y mediante secuenciación. Ante la imposibilidad de conseguir cepas de *M.canettii* se trabajó directamente con el ADN cedido por Hain Lifescience®.

3.2.6 Extracción de ADN de las cepas utilizadas para el diseño del SO-MTBC

La extracción del material genético de las cepas con las que se trabajó para el diseño de la técnica, se realizó de forma automatizada con el equipo NucliSENS easyMag® (BioMerieux). Para ello, se tomó 500µl de la cepa crecida en medio líquido y se le

adicionó 50 µl de lisozima (50mg/ml). Posteriormente se inactivó la mezcla a 95°C durante 90 min. Tras éste procedimiento preparatorio se introdujo 500 µl en el equipo extractor automatizado siguiendo las normas del fabricante y se obtuvo un eluido de 110 µl. Este eluido de ADN se conservó a -20°C hasta su posterior análisis. La medida de la concentración de ADN obtenido tras la extracción se realizó mediante espectrofotometría con el equipo NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific).

3.2.7 Condiciones de PCR uniplex para cada una de las RD seleccionadas para el SO-MTBC

La reacción de PCR uniplex fue realizada en volúmenes finales de 25 µl (Tabla 10). Se utilizaron en torno a 5-10 ng de ADN genómico por reacción. La mezcla de reacción contenía 2,5µl de Buffer 5x, 2 µl de MgCl₂ 25mM, 2 µl de una mezcla de dNTPs a 2,5mM, 1 U GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, Wisconsin, USA), 2 µl de oligonucleótidos (forward y reverse) y 2,5 µl de agua estéril. Se introdujo siempre un control negativo (agua) y ADN de una cepa de *M.tuberculosis*. La reacción se realizó en un termociclador Labcycler (SensoQuest, Göttingen, Alemania). Esta reacción se hizo para cada una de las regiones y en cada una de las cepas del complejo *M.tuberculosis* hasta completar el algoritmo propuesto con el fin de comprobar la presencia o ausencia de las regiones elegidas para el diseño del SO-MTBC.

| Reactivo | Volumen (µL) | Tª (°C) | Tiempo |
|------------------------|--------------|---------|--------|
| Agua | 6.3 | 95 | 1 min |
| Buffer 5x | 2.5 | 92* | 20 s |
| MgCl ₂ 25mM | 2 | 55* | 30s |
| dNTPs 2.5mM | 2 | 72* | 30s |
| Primer (F+R) 25µM | 2 | 72 | 2 min |
| Taq 5U/µL | 0.2 | 4 | ∞ |
| ADN | 10 | | |
| Total (µL) | 25 | | |

Tabla 10: Condiciones de la PCR uniplex

* 40 ciclos

3.2.8 Electroforesis de los productos de amplificación de las RD seleccionadas para el SO-MTBC

Para la visualización de los productos de amplificación generados en cada una de las reacciones individuales de PCR se realizaron electroforesis. Se fundieron soluciones de agarosa (Promega) de concentración del 2 % en tampón TAE 1x y se dejaron solidificar en bandejas para geles de agarosa tras la adición de bromuro de etidio (SIGMA) a una concentración final de 0,1 g/ml. Las muestras se mezclaron con tampón de carga a razón 10:1 (v/v) y fueron cargadas junto a marcadores de tamaño molecular de 100 bp (Bench Top 100bp DNA ladder, Promega), para poder estimar el tamaño de los fragmentos de ADN. El desarrollo de la electroforesis se realizó con voltajes entre 40 V y 100 V hasta obtener la resolución requerida. El ADN fue visualizado utilizando un transiluminador. Finalmente, las parejas de cebadores para amplificar cada una de las zonas seleccionadas se eligieron en base a la adecuación del producto generado tras su visualización electroforética.

3.2.9 Condiciones de PCR multiplex del SO-MTBC

Una vez seleccionados los cebadores que iban a formar parte de la reacción en base a la visualización de los productos de amplificación generados en las PCR individuales de cada zona, se procedió a la mezcla de todos ellos junto con los demás componentes hasta conseguir las mejores condiciones de reacción. La reacción de PCR multiplex fue realizada en volúmenes finales de 37 μ l. Las condiciones de la reacción vienen detalladas en la Tabla 11.

| Reactivo | Volumen (µL) | Tª (°C) | Tiempo |
|-----------------------|--------------|---------|--------|
| Buffer 10x | 3.7 | 95 | 1 min |
| Mg ⁺⁺ 25mM | 3.1 | 92* | 20 s |
| dNTPs 2.5mM | 3.1 | 55* | 45s |
| Agua | 2.6 | 72* | 45s |
| RD1.1 (12.5µM) | 0.6 | 72 | 2 min |
| RD4.2 (12.5µM) | 1.5 | 4 | ∞ |
| RD9.2 (12.5µM) | 1.5 | | |
| RD12.3 (12.5µM) | 2.8 | | |
| ITS (12.5µM) | 1.5 | | |
| Betaina 5M | 5 | | |
| BSA 25x | 1 | | |
| Taq 5U/µL | 1 | | |
| ADN | 10 | | |
| Total | 37 | | |

Tabla 11: Condiciones PCR multiplex

*:40 ciclos

3.2.10 Procedimiento de la técnica SO-MTBC

Una vez finalizada la amplificación de ácidos nucleicos se procede a la detección en tira de nitrocelulosa del producto obtenido. El procedimiento se llevó a cabo del mismo modo que el descrito previamente en el apartado 3.1 para el SO-DMT. En las posiciones de la tira reactiva en las que el oro reacciona, aparecerán líneas rojas (Figura 15). Esta técnica es más sensible y específica que la PCR tradicional. La doble hibridación permite discriminar entre fragmentos amplificados específicos y no específicos. Las bandas que podemos observar son las siguientes (

Figura 16):

- Línea de control de producto: Siempre debe ser positiva y legible si el test ha sido realizado correctamente. Esta línea indica que el oro coloidal ha funcionado correctamente, la viabilidad de la sonda es adecuada y la solución de hibridación fluye correctamente.

Materiales y métodos

- Línea control de la amplificación de PCR: La ausencia de una banda roja en esta posición indica la presencia de inhibidores en la muestra que podrían haber interferido en la reacción de amplificación o la inadecuada extracción de ADN de la muestra. En muestras fuertemente positivas la línea podría ser débil o negativa, debido a un alto contenido en diana específica en la muestra, no invalidando el resultado final.
- Línea test: Se incluyen cinco bandas diferentes, una para cada diana diferente; éstas son: RD1, RD4, RD9, RD12 y ITS. La presencia de una banda roja en cada una de estas posiciones indicará la presencia de dicho fragmento genético en el ADN estudiado.

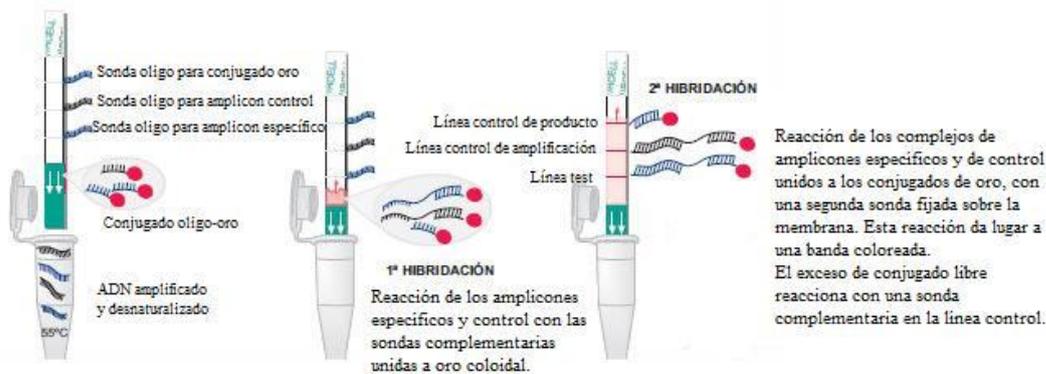


Figura 15: Esquema de doble hibridación en la tira de nitrocelulosa

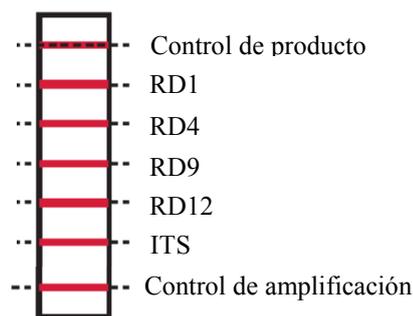


Figura 16: Esquema de visualización de bandas en la tira de nitrocelulosa del SO-MTBC

3.3 Validación del SO-MTBC en comparación con GenoType® MTBC

3.3.1 Cepario de *Mycobacterium tuberculosis* complex para la evaluación del SO-MTBC

En la evaluación del SO-MTBC se incluyeron 189 cepas de *M.tuberculosis* complex que habían sido aisladas de muestras clínicas de pacientes con sospecha de tuberculosis durante el periodo de Enero 2011 a Diciembre 2014 en el HUVN. La identificación de las cepas se realizó con BD MGIT™ TBc Identification Test que detecta la proteína MPT64 en cultivos líquidos.

3.3.2 Cepario de micobacterias no tuberculosas y otros géneros relacionados para la evaluación del SO-MTBC

Se utilizaron 23 aislados de micobacterias no tuberculosas, una cepa de *Nocardia* spp. y una de *Rhodococcus* spp. (Tabla 12) para la evaluación de la especificidad del ensayo diseñado. Las cepas de MNT fueron previamente identificadas por métodos como la espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker, EEUU.) y ensayos moleculares como GenoType Mycobacteria CM/AS (Hain Lifescience, Nehren, Alemania). Las cepas de *Nocardia* spp. y *Rhodococcus* spp. fueron identificadas por procedimientos habituales.

| Micobacterias no tuberculosas (n° de cepas) | |
|---|------------------------------------|
| <i>M. abscessus</i> (1) | <i>M. xenopi</i> (1) |
| <i>M. avium</i> (1) | <i>M. avium-intracellulare</i> (2) |
| <i>M. chelonae</i> (2) | <i>M. goodii</i> (2) |
| <i>M. fortuitum</i> (2) | <i>M. lentiflavum</i> (1) |
| <i>M. intracellulare</i> (2) | <i>M. mageritense</i> (1) |
| <i>M. scrofulaceum</i> (1) | <i>M. senegalense</i> (1) |
| <i>M. marinum</i> (1) | <i>M. kansasii</i> (2) |
| <i>M. porcinum</i> (1) | <i>M. septicum</i> (1) |
| <i>M. gastri</i> (1) | |
| Otros géneros relacionados (n° cepas) | |
| <i>Nocardia</i> spp. (1) | <i>Rhodococcus</i> spp. (1) |

Tabla 12: Especies de MNT y de géneros relacionados testadas mediante SO-MTBC

3.3.3 Crecimiento de las cepas utilizadas para la validación del SO-MTBC

Se inoculó 100 µl de cepa congelada, en medio líquido MGIT y se incubó en el sistema automático BACTEC MGIT 960. Cuando el incubador detectó crecimiento en el tubo MGIT se llevó a cabo la extracción del material genético. Además se realizó una tinción de Zielh-Neelsen para comprobar la presencia de BAAR y una siembra en agar sangre para comprobar la ausencia de contaminación con bacterias habituales.

3.3.4 Extracción de ADN de las cepas utilizadas para la validación del SO-MTBC

Las cepas clínicas se sometieron al proceso de extracción de ADN descrito a continuación para posteriormente ser utilizado en las reacciones de amplificación:

- Separar 1ml del tubo MGIT y centrifugar a 12.000g durante 15min.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 150 µl de Sample solution (Vircell). Incubar a 95° durante 1 hora.

- Centrifugar a 12.000g durante 5 min y recoger el sobrenadante (donde está el ADN) en un nuevo vial que se conservará a -20°C hasta su posterior análisis.

Para comprobar la correcta inactivación de las cepas, se realizó la siembra tanto en medio sólido como en líquido de los correspondientes productos inactivados y se incubaron a 37°C durante 45 días. Se evaluó la presencia o ausencia de crecimiento micobacteriano de forma semanal.

3.3.5 Conservación de ADN de las cepas

El ADN de las cepas extraídas se conservó a -20° hasta su posterior análisis.

3.3.6 Realización del SO- MTBC en cepas clínicas

Una vez diseñada y optimizada la técnica diagnóstica SO-MTBC, se llevó a cabo el análisis de las cepas provenientes de enfermos diagnosticados de tuberculosis en Granada durante el periodo de estudio de 2011 a 2014. Para ello se preparó un liófilo de la mezcla de reacción y se añadió 27 µl de dicha mezcla de reactivos previamente reconstituida a 10 µl de ADN extraído. Se realizó la PCR y posteriormente se desnaturalizó el producto de PCR obtenido y se hibridó en las tiras anotando las bandas que aparecían en cada caso. Del mismo modo fueron analizadas las cepas seleccionadas de MNT y otros géneros relacionados mostradas previamente en la Tabla 12.

3.3.7 Realización del GenoType® MTBC

El kit GenoType® MTBC (Hain Lifescience) se realizó con objeto de comparar los resultados obtenidos en las cepas clínicas analizadas con SO-MTBC. Para seleccionar las cepas que se iban a analizar, se realizó un muestreo aleatorio simple con el programa EPIDAT 3.1 de las cepas identificadas como *M.tuberculosis* con SO-MTBC. Por otra parte, todas las cepas identificadas como otra especie del complejo diferente a *M.tuberculosis* se analizaron con el kit GenoType® MTBC.

El procedimiento de la técnica GenoType MTBC® es el siguiente:

- Se prepara para cada muestra 10 µl Mezcla de Amplificación A, 35 µl Mezcla de Amplificación B y 5 µl de solución de DNA (volumen final: 50 µl).

Materiales y métodos

- Se introducen los tubos en un termociclador. Las condiciones de PCR son la detalladas en la Tabla 13:

| Tiempo y temperatura | Nº de ciclos |
|----------------------|--------------|
| 15 min 95°C | 1 ciclo |
| 30 s 95°C | 10 ciclos |
| 2 min 58°C | |
| 25 s 95°C | 20 ciclos |
| 40 s 53°C | |
| 40 s 70°C | |
| 8 min 70°C | 1 ciclo |

Tabla 13: Condiciones de PCR para el ensayo GenoType® MTBC

- Seguidamente, los productos de amplificación se someten a un proceso de hibridación en el equipo Auto-LiPA (Siemens), utilizando los siguientes reactivos proporcionados en el kit: solución de desnaturalización, tampón de hibridación, solución de lavado astringente (STR), solución de aclarado (RIN), conjugado concentrado, tampón del conjugado, sustrato concentrado, tampón del sustrato y tiras de membranas recubiertas con sondas específicas.
- Los resultados obtenidos se interpretan según el patrón de bandas obtenido. En la Figura 17 se muestran los posibles patrones de bandas y su interpretación.

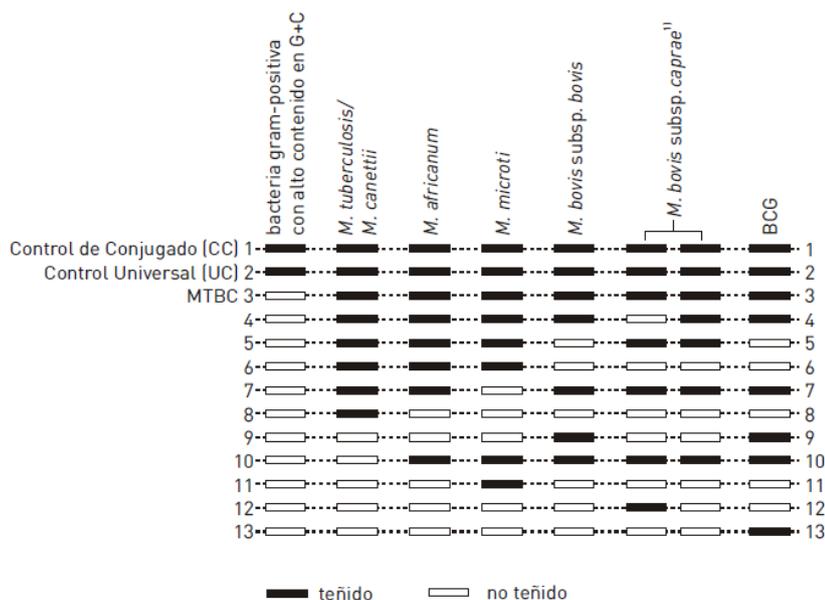


Figura 17: Tabla de interpretación de los resultados obtenidos en el kit GenoType® MTBC

3.4 Descripción de los casos de tuberculosis en el Área Norte de Granada

Se realizó un estudio observacional descriptivo de los casos de tuberculosis diagnosticados en el Área Norte de Granada entre el 1 de enero de 2011 y el 31 de diciembre de 2014. Este área pertenece al centro hospitalario el HUVN, con una población de derecho de 439.035 personas; comprendiendo a los Distritos Sanitarios de Atención Primaria Granada Norte, Santa Fé, Centro Penitenciario de Albolote y la Zona Básica de Salud de Alcalá la Real (Jaén).

Se definió como caso de tuberculosis aquel paciente que cumplía uno de los siguientes criterios:

- a) caso confirmado bacteriológicamente (cultivo y/o PCR positiva para *M.tuberculosis* complex),
- b) caso con diagnóstico anatómico-patológico compatible con tuberculosis,
- c) caso no confirmado bacteriológicamente, pero que a juicio del médico presentaba clínica y radiología compatibles con tuberculosis, y además, se le prescribió una pauta completa de tratamiento antituberculoso.

3.4.1 Variables sociodemográficas y clínicas incluidas en el estudio

Se estudiaron y compararon las siguientes variables sociodemográficas:

- Edad.
- Sexo: hombre o mujer.
- Nacionalidad de los pacientes: autóctonos o extranjeros y su país de origen.

Se estudiaron y compararon las siguientes variables clínicas:

a) Relacionadas con la enfermedad:

- Localización anatómica: pulmonar y extrapulmonar (pleural, linfática, genitourinaria, sistema nervioso central, osteoarticular, diseminada y otros órganos).
- Síntomas: Fiebre, pérdida de peso, expectoración y neumonía.
- Factores de riesgo: VIH/SIDA, abuso de alcohol, usuarios de drogas vía parenteral (UDVP), tabaquismo, toxicomanías, diabetes, inmunodeficiencias, EPOC, hepatitis, insuficiencia renal crónica, terapias inmunosupresoras, desnutrición y cáncer de vejiga.
- Tratamiento recibido: pauta y duración.

- Recidiva de la enfermedad o caso nuevo.
 - Radiografía de tórax: normal, anormal no cavitada o anormal cavitada.
 - Procedencia: hospitalaria o extrahospitalaria.
 - Hospitalización: Si fue necesaria y los días de estancia hospitalaria.
 - Estudio de contactos: Si se realizó, el número de contactos estudiados y el resultado de dicho estudio.
- b) Relacionadas con el diagnóstico microbiológico:
- Tipo de muestra enviada al laboratorio
 - Resultado de la baciloscopia.
 - Resultado del cultivo en medio líquido o sólido y microorganismo aislado.
 - Antibiograma: sensibilidad a isoniazida, rifampicina, estreptomycin, etambutol y pirazinamida.

3.4.2 Fuentes de información utilizadas para la recopilación de datos

Como fuentes de información se han utilizado:

- El sistema informático del laboratorio de Microbiología del HUVN, Microb dynamic (Francisco Soria Melguizo, S.A).
- Datos proporcionados por la sección de epidemiología de la Delegación de Salud de Granada.
- Conjunto mínimo de datos básicos (CMBD): Aportado por la unidad de Documentación clínica del HUVN y la historia clínica de los pacientes

3.4.3 Diagnóstico microbiológico

Para el procesamiento rutinario de las muestras recibidas en el laboratorio de Microbiología del Hospital con sospecha de infección tuberculosa se siguió el esquema que se muestra en la Figura 18

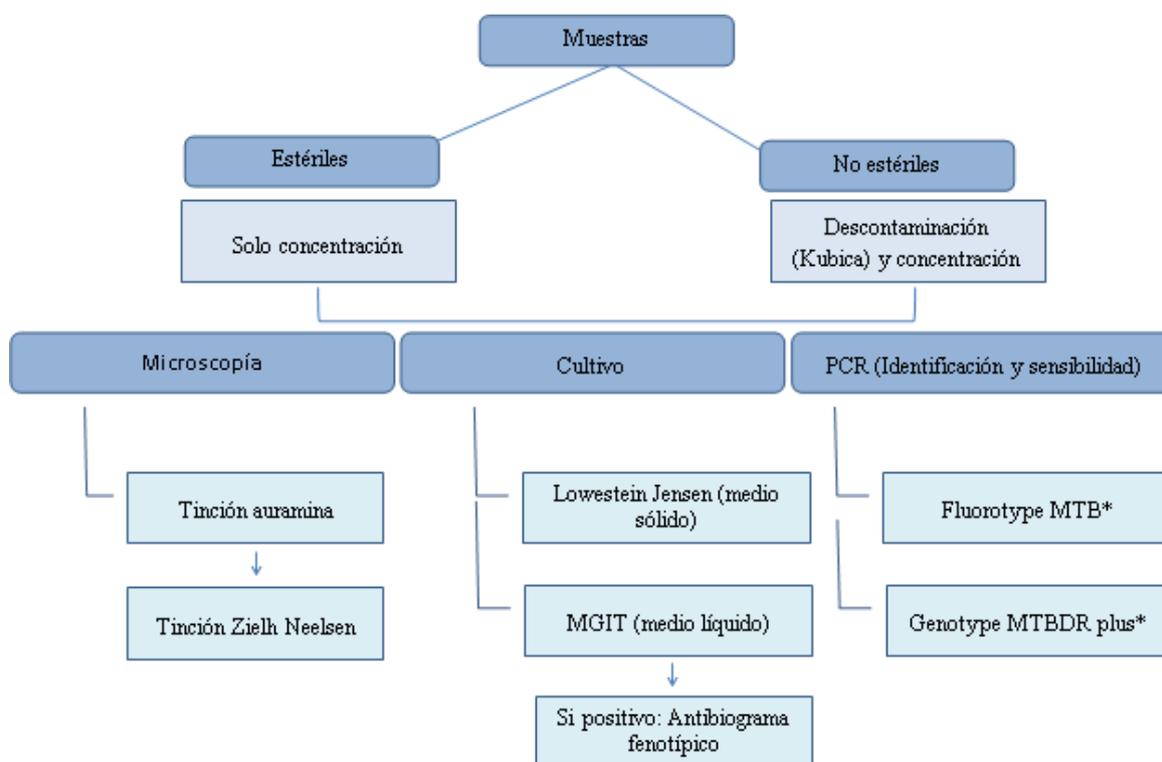


Figura 18: Esquema de procesamiento de las muestras en el laboratorio

*Estas técnicas solo se aplican bajo petición expresa del facultativo y en aquellos casos con información clínica relevante de proceso compatible con tuberculosis.

3.4.3.1 Tipos de muestras utilizadas para el diagnóstico microbiológico

Las muestras incluidas en el estudio fueron:

- Esputo (espontáneo, inducido)
- Broncoaspirado (BAS)
- Biopsias (óseas, pleurales, adenopatías, de colon, pulmonares)
- Líquidos (pleural, cefalorraquídeo, articular)
- Abscesos (hepático, torácico, vertebral, cervicofalcial)
- Aspirados (bronquial, gástrico, vertebral)
- Lavado broncoalveolar (BAL)
- Orina
- Otras: sangre, exudado de herida, drenajes

3.4.3.2 Procesamiento de muestras

La digestión y descontaminación consistió en añadir a las muestras una solución de sosa-citrato-cisteína, que se prepara añadiendo N-acetil-cisteína, a una solución de sosacitrato (2%) ¹⁴⁵ (Reactivos para diagnóstico S.L, España).

El tratamiento de los esputos y otras muestras no estériles (excepto aspirados gástricos) se realizó de la siguiente manera:

- Fluidificar la muestra y añadir un volumen de la solución descontaminante igual al de la muestra mezclando con vortex.
- Dejar actuar durante 15 minutos. Después añadir cantidad suficiente de buffer fosfato (Reactivos para diagnóstico S.L, España) hasta 50 mL.
- Centrifugar 20 min a 2500 rpm en la centrífuga Digtor 21 (Ortoalresa, Madrid, España) y dejar reposar.
- Decantar el sobrenadante y utilizar el sedimento para realizar tinciones, cultivo y PCR.

3.4.3.3 Microscopía

Para la visualización al microscopio de las extensiones de las muestras se utilizó la tinción de auramina y la tinción de Ziehl-Neelsen. Posteriormente se procedió a la visualización las extensiones en el microscopio (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) utilizando el objetivo de 40x y con luz ultravioleta en el caso de la tinción de auramina y con el objetivo 100x en el caso de la tinción de Ziehl-Neelsen.

3.4.3.4 Cultivo

3.4.3.4.1 Medio sólido

Se utilizó el medio de cultivo Lowestein-Jensen (Difco, Francisco Soria Melguizo, S.A.; España) para el cultivo de micobacterias. Se incubó en posición horizontal durante 10-15 días para garantizar la absorción de la muestra en toda la superficie y posteriormente de forma vertical en atmósfera de 37°C. Los tubos se observaron dos veces en semana hasta finalizar el periodo de incubación (42 días).

3.4.3.4.2 Medio líquido

Se utilizó el medio MGIT (Middlebrook 7H9 modificado). Se inoculó 0,5 ml de la muestra previamente descontaminada y concentrada y se añadió 0.8 ml de una mezcla que contiene OADC (Ácido oléico, Albúmina bovina, Catalasa y Dextrosa) (BBL™ MGIT™ Becton Dickinson, EE. UU.) para facilitar el crecimiento de las micobacterias y PANTA (Polimixina B, Anfotericina B, Ac nalidíxico, Trimetoprim, Azlocilina) (BBL™ MGIT™ Becton Dickinson, EE. UU.) como inhibidor de microbiota acompañante. Se incubó a 37°C en el sistema automatizado BACTEC MGIT 960 BD (Becton Dickinson, EE. UU.) durante un máximo de 42 días. El tubo BBL Culture Médium contiene una matriz fluorescente (tris-4,7difenil-1, fenantrolina rutenio). Cuando existe crecimiento del microorganismo, se produce un consumo de oxígeno y un aumento de la liberación del dióxido de carbono al interior del tubo. Esta situación se detecta al incidir luz UV de 365 nm por la parte inferior del tubo y éste será considerado como positivo.

3.4.3.5 Antibiograma

Se utilizó el BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE Kit (Becton Dickinson EE. UU.) para determinar la susceptibilidad a estreptomicina, isonizida, rifampicina y etambutol y el BACTEC™ MGIT™ 960 PZA Kit (Becton Dickinson EE. UU) para determinar la susceptibilidad a pirazinamida. La lectura se efectuó de forma automática por el equipo BACTEC™ MGIT™ 960 Mycobacterial Detection System. Los pasos a seguir partiendo del cultivo líquido son los siguientes:

- Añadir 0,8 ml de suplemento BACTEC MGIT 960 SIRE a cada uno de los tubos MGIT.
- Añadir 100µl de cada droga en el tubo correspondiente. Los antibióticos se preparan previamente para conseguir una concentración de 83 µg/mL de estreptomicina, 8,3 µg/mL de isoniazina, 83 µg/mL de rifampicina, 415 µg/mL de etambutol y 8000 µg/mL de pirazinamida. Esto supone una concentración final en el tubo MGIT de 1 µg/mL para S y RIF; 0,1 µg/mL para INH; 5 µg/mL para E y 100 µg/mL para PZA.
- Utilizar el tubo MGIT directamente como inóculo micobacteriano si estamos dentro de los 2 primeros días de positividad, si el antibiograma se realiza entre

los días 3-5 de positividad, realizar una dilución 1:5 del tubo MGIT para tener el adecuado.

- Preparar el inóculo de control de crecimiento, que será una dilución 1:100 de tubo MGIT crecido (para el caso de la pirazinamida el inóculo de control de crecimiento es una dilución 1:10) si se está utilizando un tubo MGIT positivo de menos de cinco días.
- Inocular el tubo de control de crecimiento con 500 µl de la dilución 1:100.
- Inocular el resto de los tubos con drogas con 500 µl del tubo MGIT crecido.
- Introducir los tubos inoculados en el incubador BACTEC MGIT 960.

Tras un periodo de 4-13 días el sistema emitirá un informe cualitativo de la susceptibilidad de la cepa en cuestión.

3.4.3.6 Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos de muestra directa

Se utilizó el kit FluoroType® MTB (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Alemania) para la detección de *M.tuberculosis* complex en muestras descontaminadas. Se trata de un sistema cerrado y automatizado de PCR y sondas fluorescentes para la detección con emisión de los resultados en 3 horas. Aquellas muestras con especial sospecha de tuberculosis o muestras invasivas se sometieron a ésta técnica, que se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.4.3.7 Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos para la determinación de resistencias a izonizida y rifampicina

Se utilizó el kit Genotype MTBDR Plus (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Alemania) para estudiar las resistencias a INH y RIF (mutaciones de los genes *inhA*, *katG* y *rpoB*) por métodos moleculares en muestras clínicas con baciloscopia positiva y en cepas aisladas por cultivo. Se siguieron las instrucciones del fabricante para la realización de la técnica.

3.4.4 Conservación de cepas

Durante el periodo de estudio se conservó una alícuota a -80° en criotubos (Microbank™ microbial storage, Pro Lab Diagnostics) de cada una de las cepas de *M.tuberculosis* complex aisladas a partir de medios de cultivo sólidos y/o líquidos.

3.4.5 Análisis estadístico

Los datos se recogieron en una tabla Excel para su posterior análisis con el software SPSS 18.0. (SPSS Inc., Chicago, Illinois) Para la elaboración de tablas y gráficos se utilizó el programa Excel.

Se calculó la incidencia de tuberculosis teniendo en cuenta el número de personas en riesgo a partir de los datos aportados por el Servicio de Sistemas de la Información y Nuevas Tecnologías del HUVN de Granada. Se realizó un estudio descriptivo de las demás variables de estudio. Se calcularon medidas de tendencia central y dispersión para las variables cuantitativas y frecuencias absolutas y relativas para el resto de variables.

Posteriormente también se utilizó esta misma base de datos para realizar un análisis bivariante con objeto de estudiar las variables relacionadas con la especie del complejo productora de la infección.

▶ RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Evaluación del SO-DMT en muestras clínicas respiratorias

El laboratorio de Microbiología del HUVN formó parte de la evaluación del SO-DMT realizando un estudio prospectivo durante los meses de enero a abril de 2011. Se incluyeron 249 muestras clínicas respiratorias (208 esputos, 19 aspirados gástricos, 15 BAS y 7 BAL) de pacientes con sospecha de tuberculosis. Según se muestra en los Gráfico 1 y Gráfico 2, se observaron BAAR en la tinción de Ziehl de 8 muestras de esputo (3%); en el resto de las 241 muestras (97%) la baciloscopia resultó negativa. Teniendo en cuenta el cultivo, en 15 (6,02%) muestras se identificó *M.tuberculosis* complex, en 3 (1,21%) muestras se aislaron micobacterias no tuberculosas (1 *M.avium*, 1 *M.fortuitum* y 1 *M.abscessus*), 10 (4,02%) cultivos resultaron contaminados y 221 (88,76%) cultivos fueron negativos.

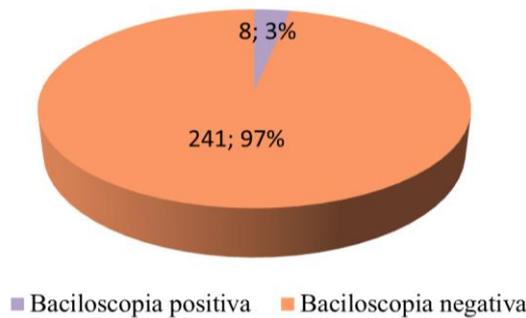


Gráfico 1: Resultados de la baciloscopia de las muestras del HUVN en la evaluación del SO-DMT

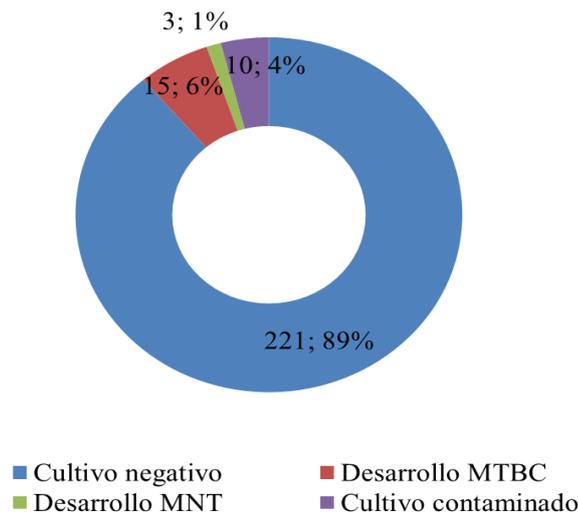


Gráfico 2: Resultados del cultivo de las muestras del HUVN en la evaluación del SO-DMT

SO-DMT identificó correctamente las 15 muestras donde creció posteriormente *M.tuberculosis* complex. Así mismo, SO-DMT detectó en 9 muestras la presencia de

Resultados

ADN de micobacterias a nivel de género, aunque solo en una de ellas creció posteriormente una MNT, en este caso *M.avium*; el resto resultaron negativas por cultivo. De las 225 muestras con resultado negativo en SO-DMT, en 2 se aislaron MNTs (*M. fortuitum* y *M. abscessus*), 10 muestras resultaron contaminadas y 213 fueron negativas por cultivo (ver Tabla 14).

SO-DMT mostró una sensibilidad y especificidad del 100% con respecto al cultivo para detectar MTBC en muestras clínicas respiratorias, sin embargo la sensibilidad para detectar las MNT con respecto al cultivo fue del 33,3% y la especificidad fue 96,4%.

| | | Resultados SO DMT | | |
|-----------------------|-------------------------------|-------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| | | Negativo | <i>M.tuberculosis</i> complex | Género <i>Mycobacterium</i> |
| Resultados cultivo | Negativo | 213 | 0 | 8 |
| | <i>M.tuberculosis</i> complex | 0 | 15* | 0 |
| | MNT | 2** | 0 | 1 |

Tabla 14: Resultado de la evaluación del SO-DMT en muestras respiratorias de pacientes del HUVN

*8 muestras con baciloscopia positiva y 7 con baciloscopia negativa

** *M.fortuitum* y *M.abscessus* en muestras de aspirado gástrico de niños

La evaluación multicéntrica del SO-DMT ¹⁴⁶ junto con el Hospital Universitario Carlos Haya (HUCH) de Málaga se realizó con un total de 566 muestras clínicas respiratorias (249 aportadas por el HUVN y 317 por HUCH), excluyendo 28 por resultar contaminado el cultivo. De toda la serie de muestras estudiadas 28 tuvieron la baciloscopia positiva. En este grupo SO-DMT mostró una sensibilidad del 93% y valor predictivo positivo 100%. En el grupo de muestras con baciloscopia negativa (n=510) la sensibilidad fue 56% y valor predictivo negativo 98%. En las 43 muestras donde se identificó MTBC por cultivo, la sensibilidad del SO-DMT fue 86% y valor predictivo positivo 100%. Para la detección del género *Mycobacterium* en muestras con presencia de una MNT (n=10), el SO-DMT mostró una la sensibilidad del 30% y un valor predictivo positivo del 100%. Se observó que la correlación entre los resultados obtenidos con SO-DMT y los hallazgos clínicos y/o microbiológicos para enfermedad producida por micobacterias fue del 100% en pacientes con baciloscopia positiva, 65% en pacientes con baciloscopia negativa y 92,2% en pacientes sin enfermedad por

MTBC/MNT. En la Tabla 15 se desglosan los resultados de la comparación del SO-DMT con los resultados del cultivo y la baciloscopia de las muestras (n=538)

| TABLA A: (SO-DMT positivo; n=47) | Cultivo positivo MTBC | Cultivo positivo MNT | Cultivo negativo |
|---|--|---------------------------------------|-------------------------|
| Baciloscopia negativa | 13 | 1 | 7 |
| Baciloscopia positiva | 24 | 2 | 0 |
| TOTAL | 37 | 3 | 7 |

| TABLA B: (SO-DMT negativo; n=491) | Cultivo positivo MTBC | Cultivo positivo MNT | Cultivo negativo |
|--|--|---------------------------------------|-------------------------|
| Baciloscopia negativa | 6 | 5 | 478 |
| Baciloscopia positiva | 0 | 2 | 0 |
| TOTAL | 6 | 7* | 478 |

Tabla 15: Comparación de resultados de SO-DMT con el cultivo y la baciloscopia. Tabla A: Muestras con SO-DMT positivo (n=47). Tabla B: Muestras con SO-DMT negativo (n=491). *El resultado de SO-DMT fue positivo para MTBC en una muestra y para MNT en 6 muestras

4.2. Diseño del SO-MTBC para la diferenciación de las especies del complejo

M.tuberculosis

4.2.1. Elección de RD para formar parte del algoritmo diagnóstico del SO-MTBC

Tras el estudio bibliográfico de las regiones RD se consiguieron elaborar dos propuestas basándose en la presencia y ausencia de diferentes RDs (RD1, RD3, RD4, RD5/RD6, RD9, RD12 y RD13) para la diferenciación del complejo *M.tuberculosis* utilizando un mínimo de 4 zonas del genoma (ver Tabla 8 de materiales y métodos). Como ya hemos visto anteriormente, además de las regiones incluidas en los dos algoritmos existen otras RDs, que también pueden tener utilidad en la diferenciación del complejo *M.tuberculosis*. Para facilitar el diseño de la técnica, lo ideal es utilizar el menor número posible de regiones; de éste modo se podrían evitar posibles interferencias entre los reactivos y aumentaría el rendimiento de la reacción. Por ello, a pesar de que existen otras muchas regiones de diferenciación descritas para desmembrar el complejo, no se han incluido en ningún otro algoritmo debido a la necesidad de emplear más de cuatro zonas para poder diferenciar las 7 especies del complejo.

La región RD3 de ~10kb de longitud corresponde a un fago, también denominado phiRv1. Su uso conllevaba varios problemas; en primer lugar se ha observado la presencia variable de ésta región en cepas de *M.tuberculosis*^{147,148} y *M.bovis*¹⁴⁹. Además el hecho de que sea un fago y que pueda localizarse en distintos sitios del cromosoma dificulta el hecho de poder demostrar mediante PCR la delección de este elemento en una región concreta del genoma. Debido a la presencia de dicho elemento genético móvil en la región RD3 hace que las zonas colindantes no estén muy conservadas y esto podría suponer una dificultad a la hora de la amplificación¹⁵⁰. El resto de regiones presentes en el algoritmo nº2 (RD5/6, RD9 y RD13) no presentan éste tipo de problema y se podrían utilizar para la diferenciación; pero al no servir la región RD3 por los motivos explicados anteriormente, no podrían diferenciarse con ese algoritmo *M.bovis* de *M.bovis* BCG, *M.tuberculosis* de *M.canettii* ni *M.africanum* de *M.microti*. Por esto se decidió descartar el algoritmo nº2 y se pensó que las regiones que mejor podían diferenciar los miembros complejo *M.tuberculosis* eran RD1, RD4, RD9 y RD12 que son las que forman parte del algoritmo propuesto nº 1 (Tabla 16). Estudios publicados anteriormente sobre el rendimiento del uso de éstas regiones en reacciones de amplificación hacen pensar que son buenas opciones para diferenciar el complejo *M.tuberculosis*. A continuación se describen las regiones que se utilizaron como dianas en el kit SO-MTBC.

| Región ADN | <i>M. tuberculosis</i> | <i>M. bovis</i> | <i>M. bovis</i> BCG | <i>M. africanum</i> | <i>M. microti</i> | <i>M. caprae</i> | <i>M. canettii</i> |
|------------|------------------------|-----------------|------------------------|---------------------|-------------------|------------------|--------------------|
| RD1 | + | + | - | + | - | + | + |
| RD4 | + | - | - | + | + | + | + |
| RD9 | + | - | - | - | - | - | + |
| RD12 | + | - | - | + | + | - | - |
| ITS | + | + | + | + | + | + | + |

Tabla 16: Algoritmo definitivo para la identificación de las especies del complejo *M.tuberculosis* con SO-MTBC

(+): Región presente, (-): Región ausente (ITS): Internal Transcribed Spacer

Resultados

- Pareja RD1.1 F/R:

Ambos oligonucleótidos poseen una longitud de 18 bases y un porcentaje de GC del 50%. El producto de PCR generado tiene 127 pb (CTTCTGACCCGCTAATACGAAAAGAAACGGAGCAAAAACATGACAGAGCAGCAGTGGAATTTTCGCGGGTATCGAGGCCGCGGCAAGCGCAATCCAGGGAAATGTCACGTCCATTCATTCCCTCCTTG)

- Pareja RD1.2 F/R:

Ambos oligonucleótidos tienen una longitud de 23 bases. El porcentaje de GC que poseen es 60,9% el forward y 60,8% el reverse. El producto de PCR generado tiene 148pb

(TTCGTCAGGCCGCGCTCCAATACTCGAGGGCCGACGAGGAGCAGCAGCAGGCGCTGTCTCGCAAATGGGCTTCTGACCCGCTAATACGAAAAGAAACGGAGCAAAAACATGACAGAGCAGCAGTGGAATTTTCGCGGGTATCGAGGCC)

Las dos parejas de cebadores generaban un producto de amplificación correcto en las cepas del complejo que se esperaba (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum*, *M.caprae* y *M.canettii*) y no se produjo amplificación tal y como se esperaba en el caso de *M.bovis* BCG y *M.microti*. Se eligió la pareja denominada RD1.1 F/R para formar parte de la PCR multiplex debido a la mejor especificidad que tenía según se muestra en la Figura 20.

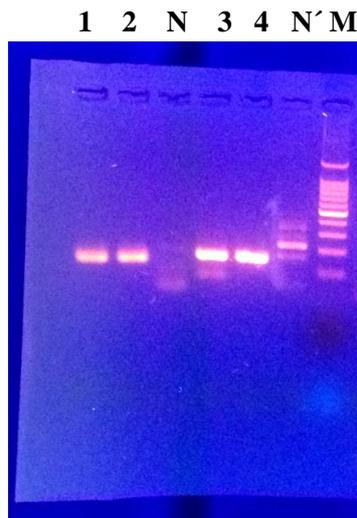


Figura 20: Electroforesis de PCR RD1 con *M.tuberculosis* y *M.caprae*

Líneas: 1: RD1.1 *M.caprae*, 2: RD1.1 *M.tuberculosis*, N: RD1.1 control negativo, 3: RD1.2 *M.caprae*, 4: RD1.2 *M.tuberculosis*, N': RD1.2 control negativo, M: marcador pesos moleculares

4.2.2.2. RD4

Al contrario de lo que ocurre con la región RD1, los límites de la delección RD4 son iguales para todas las especies del complejo *M.tuberculosis*, así que en este caso no fue necesario que la búsqueda de cebadores se restringiera a una zona concreta de RD4.

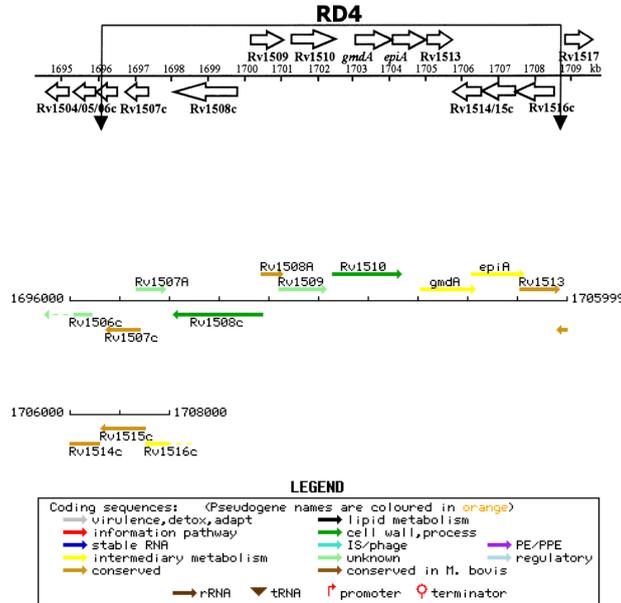


Figura 21: Esquema de la región RD4 de *M.tuberculosis*

Tomado de Brosch et al.⁵⁶ y <http://tuberculist.epfl.ch/index.html>

- Pareja RD4.1 F/R :

El primer forward tiene una longitud de 18 bases y el reverse tiene 20 bases. Ambos tienen un porcentaje GC del 55%. El producto generado tiene 165 pb
 (CAACGCCACGAAGTAAGCCAGCGGATCGGTACCACGAACCCTGTCGAGT
 TGCCTCGATCGATGACCCCCACGCCGGGATGGCCGCGGGCGCCCAGTGTCA
 CGAAGATGACCACTCGCTCCAGACCACGTGCCCCCGGGCCGCCAGATGG
 CGGGAGATATGAC)

- Pareja RD4.2 F/R:

El primer forward tiene 20 bases y un 50% de GC. El primer reverse tiene 18 bases y 61% de GC. El producto generado posee 141 pb
 (TGGTCCATGTCGATTGAGTGC GTGGATCAGTGTA AACCGTTGCGCGCCATG
 TTCTGTAGGCACTGGTTCGGGTTGTGGTTAGGCTGCACGGTTGGCAGGTTAC
 CAACCACTGAGCCCCTGGGCGGATGTGAGCTCGGACTC)

Resultados

- Pareja RD4.3 F/R

Ambos oligonucleótidos poseen una longitud de 18 bases. El porcentaje de GC que poseen es 50% el forward y 44,4% el reverse. El producto generado tiene 132 pb (CGAGGTCTATTTCTGCTGGGCGACACGGAATTATCGCGAATTGTATGGGTT GCTCGCGGTCAACAGCATCTGGTTCAATCACGAATCACCGCGTCACGGCGA GACATTCATGACTCGTAATCCTGCACCATA)

Finalmente la pareja escogida para formar parte de la técnica multiplex fue la pareja RD4.1 F/R. Amplificaba correctamente cuando la cepa ensayada era *M.tuberculosis*, *M.africanum*, *M.microti*, *M.caprae* y *M.canettii*. En el caso de *M.bovis*, *M.bovis* BCG, no aparecía tal producto de amplificación. En la Figura 22 se muestra un ejemplo de la electroforesis de los amplicones generados con ADN de las cepas de *M.tuberculosis* y *M.bovis*.

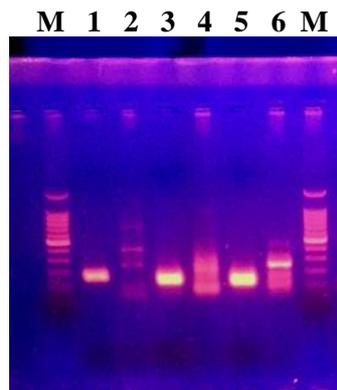


Figura 22: Electroforesis de PCR RD4 con *M.tuberculosis* y *M.bovis*

Líneas: M: marcador pesos moleculares 1: RD4.1 *M.tuberculosis*, 2: RD4.1 *M.bovis*, 3: RD4.2 *M.tuberculosis*, 4: RD4.2 *M.bovis*, 5: RD4.3 *M.tuberculosis*, 6:RD4.3 *M.bovis*, M: marcador pesos moleculares

4.2.2.3. RD9

Al igual que la región RD4, la delección RD9 es de la misma longitud para todas las especies del complejo *M.tuberculosis*, permitiendo buscar los cebadores para su amplificación en toda su extensión.

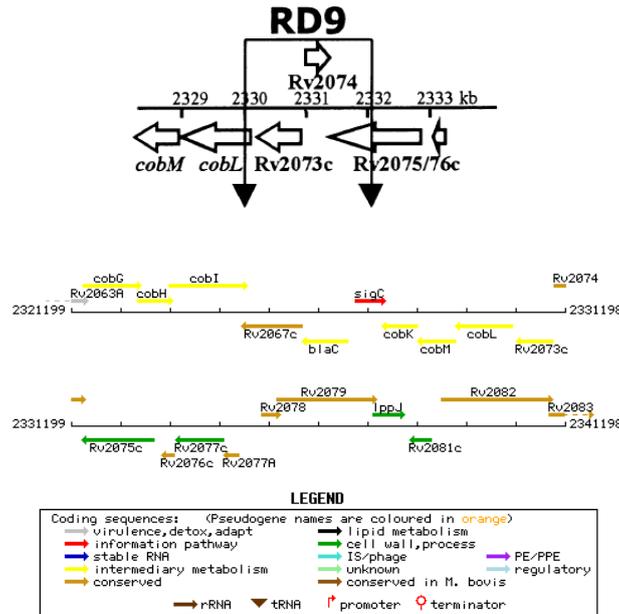


Figura 23: Esquema de la región RD9 de *M.tuberculosis*

Tomado de Brosch et al.⁵⁶ y <http://tuberculist.epfl.ch/index.html>

- Pareja RD9.1 F/R:

Ambos oligonucleótidos poseen una longitud de 18 bases y un porcentaje de GC del 55%. El producto generado tiene 102 pb
 (CCACGGCTGCGATTATTGCCTGCGCTAGCGTGAGTGGCGATGGTCAACACC
 ACTACGCGGCTTAGTGACGACGCGCTGGCGTTTCTTTCCGAAGCCATCTG)

- Pareja RD9.2 F/R

Ambos oligonucleótidos poseen una longitud de 19 bases y un porcentaje de GC del 53%. El producto generado tiene 103 pb
 (CGATGGTCAACACCACTACGCGGCTTAGTGACGACGCGCTGGCGTTTCTTT
 CCGAACGCCATCTGGCCATGCTGACCACGCTGCGGGCGGACAACCTCGCCGC
 A)

Finalmente, la pareja de cebadores escogida por su mayor rendimiento fue RD9.2 F/R. Aunque el gel demostraba cierta inespecificidad, posteriormente cuando se incorporaron las sondas de detección, se comprobó que funcionaba correctamente. Los resultados de la visualización de la amplificación fueron tal cual se esperaban, produciéndose un amplicón del tamaño esperado en el caso de *M.tuberculosis* y *M.canettii*. Para el resto de especies del complejo no se produjo amplificación de la región RD9 utilizando dicha

Resultados

pareja de cebadores En la Figura 24 se muestra un ejemplo de la electroforesis de los amplicones generados con ADN de las cepas de *M.tuberculosis* y *M.bovis* BCG.

M 1 2 3 4 M

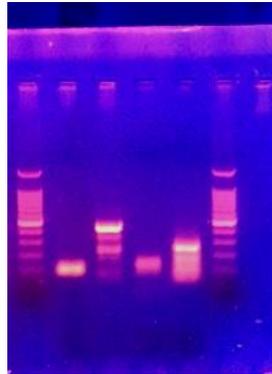


Figura 24: Electroforesis de PCR RD9 con *M.tuberculosis* y *M.bovis* BCG

Líneas: M: marcador pesos moleculares 1: RD9.1 *M.tuberculosis*, 2: RD9.1 *M.bovis* BCG, 3: RD9.2 *M.tuberculosis*, 4: RD9.2 *M.bovis* BCG, M: marcador pesos moleculares

4.2.2.4. RD12

La región RD12 cuenta con una extensión aproximada de 2.5 Kb. Las parejas de cebadores propuestos se sitúan en diversos puntos de ésta región:

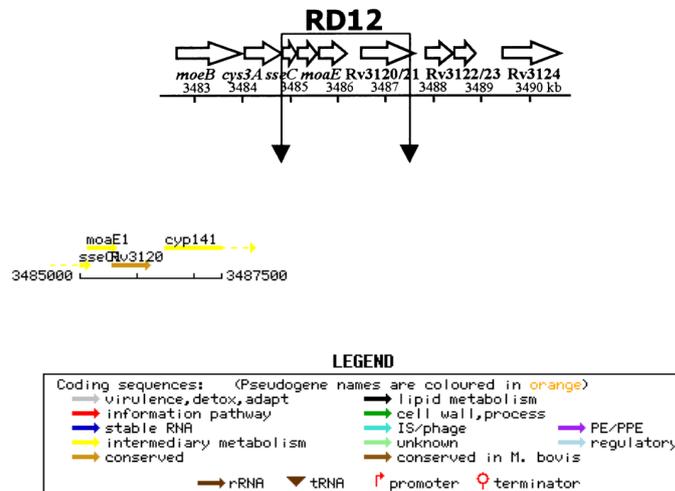


Figura 25: Esquema de la región RD12 de *M.tuberculosis*

Tomado de Brosch et al.⁵⁶ y <http://tuberculist.epfl.ch/index.html>

- Pareja RD12.1 F/R

Ambos oligonucleótidos poseen una longitud de 18 bases y un porcentaje de GC del 55%. El producto generado tiene 169 pb

Resultados

(GACAAGCACCTCGATTCCGACGTTCCCGTTCGACCCGGCCGGTCCCGACGGA
GCCGTCCCCAATGCTGTCGGAAGTCTGAGAAACAGCTGTCCGGTAGCCCCGAT
AGAGTTGCCCTCGGGGCACACAGCATGGCTCGTCACTCGCTTTGACGATGTA
AAGGGAGTGCTGTCC)

- Pareja RD12.2 F/R

El primer forward tiene una longitud de 18 bases y el reverse tiene 20 bases. Ambos tienen un porcentaje GC del 50%. El producto generado tiene 146 pb

(TGTTGAGAACCCGTTTCGCACCCGCTCCGATACCGCCAGTCTGATGCACCGA
CCGCGCCGCCTCCACCCGCGGAAGCTAACGAGGTGTGCATGAAACCGGGG
CGTTTCAGCAGCCCGGTTAATTGACAATCTGTGAAGAGGTTCCC)

- Pareja RD12.3 F/R

El primer forward tiene 18 bases y un 56% de GC. El primer reverse tiene 19 bases y 58% de GC. El producto generado posee 115 pb

(ACGTGCGTGACCACAATGCCGGGCATGATGTCACGCGGTTGTTCTACGAGG
CGTATCCGCCGATGGTGATTTCGGACATTGATGTCGATCATCGGACGGTGTGA
AGACAAGGCCGA)

Se eligió la pareja RD12.3 F/R por ser la que obtenía los mejores resultados. Con las cepas de *M.tuberculosis*, *M.africanum* y *M.microti* se obtuvieron amplicones del tamaño esperado mientras que con el resto de micobacterias del complejo no se obtuvo amplificación alguna. En la Figura 26 se muestra un ejemplo de la electroforesis de los amplicones generados con ADN de las cepas de *M.tuberculosis* y *M.bovis*.

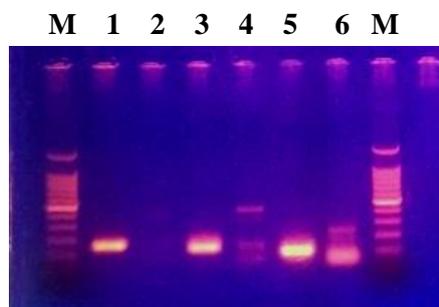


Figura 26: Electroforesis de PCR RD12 con *M.tuberculosis* y *M.bovis* BCG

Líneas: M: marcador pesos moleculares 1: RD12.1 *M.tuberculosis*, 2: RD12.1 *M.bovis* BCG, 3: RD12.2 *M.tuberculosis*, 4: RD12.2 *M.bovis* BCG, 5: RD12.3 *M.tuberculosis*, 6: RD12.3 *M.bovis* BCG, M: marcador pesos moleculares

4.2.2.5. Región ITS

ITS (internal transcribed spacer) es la región utilizada para identificar las micobacterias a nivel de género. El adecuado funcionamiento de ésta pareja de cebadores fue probado en estudios anteriores obteniendo resultados satisfactorios para todas las especies del complejo *M.tuberculosis* y presentando gran especificidad al no producir ningún producto de amplificación con micobacterias no tuberculosas (datos no mostrados). En la Figura 27 se muestra la detección del producto de amplificación generado al amplificar esta región en cada una de las micobacterias del complejo *M.tuberculosis*.

- Pareja ITS F/R:

El forward tiene 21 bases y un 48% de GC. El reverse tiene 20 bases y 55 % de GC. El producto generado tiene 124pb

(AACAAAGTTGGCCACCAACACACTGTTGGGTCCTGAGGCAACACTCGGACT
TGTTCAGGTGTTGTCCCACCGCCTTGGTGGTGGGGTGTGGTGTGTTGAGAAC
TGGATAGTGGTTGCGAGCATC)

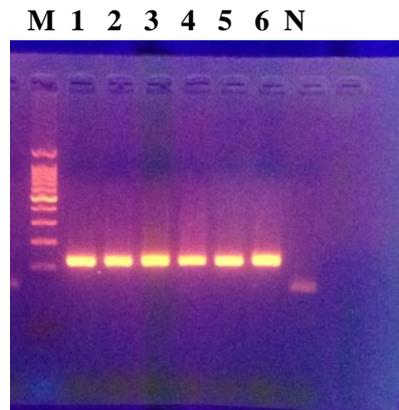


Figura 27: Electroforesis de PCR ITS de las especies del complejo *M.tuberculosis*

Líneas: M: marcador pesos moleculares, 1: *M.tuberculosis*, 2: *M.bovis*, 3:*M.bovis* BCG, 4:*M.microti*, 5: *M.africanum*, 6: *M.caprae*, N: control negativo

Además, en la reacción multiplex se incluye un control de amplificación y sus correspondientes cebadores para descartar la inhibición de la PCR en caso de estar ante una micobacteria no tuberculosa.

En la siguiente tabla (Tabla 17) se resumen las características de los cebadores elegidos para la PCR multiplex:

| Nombre | Tamaño (n°bases) | %GC | Tamaño amplicón | Diana |
|----------|------------------|-----|-----------------|---------|
| RD1.1 F | 18 | 50 | 127 | esat-6 |
| RD1.1 R | 18 | 50 | | |
| RD4.2F | 20 | 50 | 141 | Rv1508c |
| RD4.2R | 18 | 61 | | |
| RD9.2 F | 19 | 53 | 103 | Rv2074 |
| RD9.2 R | 19 | 53 | | |
| RD12.3 F | 18 | 56 | 115 | Rv3119 |
| RD12.3 R | 19 | 58 | | |
| ITS.F | 21 | 48 | 124 | ITS |
| ITS.R | 20 | 55 | | |

Tabla 17: Conjunto de cebadores que forman parte del diseño de la PCR multiplex

A cada una de las cepas de referencia del complejo *M.tuberculosis* se le realizó PCR individual de cada una de las RD y posteriormente se visualizaron los productos generados mediante electroforesis. Se comprobó que cada una de las especies generaba un patrón diferente al del resto de las especies tal cual se esperaba.

4.2.3 Sondas para detección de amplicones en SO-MTBC

Una vez conocidos los cebadores que íbamos a utilizar y el amplicón que se generaba con la reacción de PCR, se diseñaron las sondas para detectar los productos amplificadas. Para la utilización del formato Speed Oligo®, en cualquiera de sus versiones, son necesarias una sonda de captura y una sonda de detección por cada amplicón generado. Se propusieron varias sondas de captura y detección para cada caso tal y como se especificó en el punto 3.1.3 de materiales y métodos. Se probaron individualmente poniendo en contacto ambas sondas con el producto de PCR desnaturalizado y proporcionando una solución de hibridación en un termobloque a 55°C. Del mismo modo se comprobó la posible reactividad de las sondas entre sí o la presencia de reacciones inespecíficas con cualquier sustancia presente en la reacción que pudieran interferir en el resultado obtenido.

Tras estos estudios aquellas sondas que dieron una señal óptima con su amplicón y no dieron ninguna señal en ausencia de éste son las que se utilizaron en la reacción definitiva. Estas se detallan en la Tabla 18

| ZONA | SONDA | NOMBRE | SECUENCIA |
|------|-----------|---------|--------------------------|
| RD1 | CAPTURA | RD1.sc | TGACAGAGCAGCAGTGGAAAT |
| | DETECCIÓN | RD1.sd | CTAATACGAAAAGAAACGGAGCA |
| RD4 | CAPTURA | RD4.sc | GCACGGTTGGCAGGTTAC |
| | DETECCIÓN | RD4.sd | ACTGGTTCGGGTTGTGGTTA |
| RD9 | CAPTURA | RD9.sc | CTTCCGAACGCCATCTGGC |
| | DETECCIÓN | RD9.sd | GCTTAGTGACGACGCGCTGG |
| RD12 | CAPTURA | RD12.sc | TATCCGCCGATGGTGAT |
| | DETECCIÓN | RD12.sd | CGGTTGTTCTACGAGGC |
| ITS | CAPTURA | ITS.sc | TTGTTCCAGGTGTTGTCCCACCGC |
| | DETECCIÓN | ITS.sd | CTTGGTGGTGGGGTGTGGTG |

Tabla 18: Sondas seleccionadas para detectar los correspondientes productos de amplificación en SO-MTBC

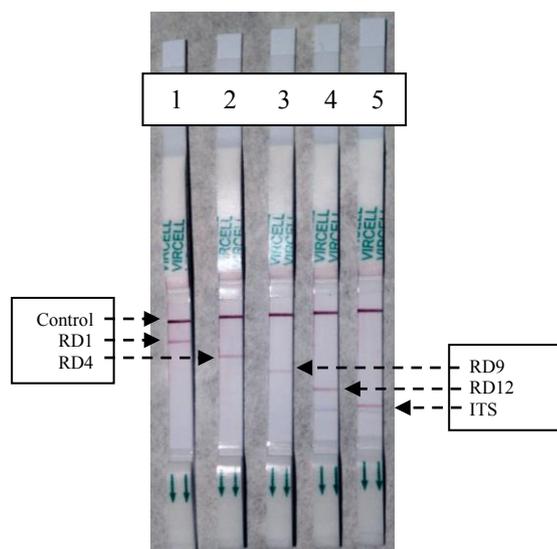


Figura 28: Detección en tira de nitrocelulosa de los productos de PCR de *M.tuberculosis*

1. RD1; 2.RD; 3.RD9; 4. RD12; 5.ITS

4.2.4 Optimización de la PCR multiplex del SO-MTBC

Para proceder al ajuste de la reacción de PCR multiplex final, se compararon en primer lugar reactivos (buffer, magnesio y Taq polimerasa) de dos casas comerciales (Roche y Promega) (ver Tabla 19) para elegir el más adecuado, teniendo en cuenta que la mezcla final se iba a someter a un proceso de liofilización. El resto de reactivos necesarios para completar la reacción (dNTPs y agua calidad PCR) fueron los mismos en ambos casos. La influencia de la utilización de dichos reactivos de diferente marca comercial en el

Resultados

resultado final se comprobó mediante la realización de varias PCR uniplex y la visualización mediante electroforesis del producto amplificado. En ambos casos se obtuvieron buenos resultados (datos no mostrados), pero debido a que la Taq polimerasa de Promega no es apta para someter a proceso de liofilización por su contenido en glicerol, se decidió utilizar la Taq polimerasa, buffer y magnesio de Roche.

| | Buffer | Magnesio | Taq polimerasa |
|----------------|--------|----------|----------------|
| Promega | 5x | 25mM | 5U/ μ l |
| Roche | 10x | 25mM | 5U/ μ l |

Tabla 19: Concentración de los reactivos probados para la PCR

Una vez elegidos los reactivos con los que se iba a trabajar se incorporaron todos los cebadores en una misma reacción y se fue ajustando. Se hicieron modificaciones sobre el programa de amplificación y sobre la concentración de otros reactivos (dNTPs, cebadores y agua) para mejorar la reacción. Inicialmente se ajustó la cantidad de cebadores necesarios para que se pudiera producir la amplificación y detección en caso de que todas las zonas estuviesen presentes (como ocurre en *M.tuberculosis*). Además se fue probando la incorporación de aditivos que mejoraran la especificidad de la reacción como betaina y BSA. Las pruebas se visualizaron mediante la hibridación en tiras marcadas con sondas y según la intensidad que mostraba se fue adaptando la cantidad y concentración de todos los reactivos. Unos ejemplos de estas pruebas se puede observar en la Tabla 20, donde se detallan las variaciones en la cantidad de algunos reactivos (principalmente magnesio, dNTPs y BSA), y a continuación en las Figura 29 y Figura 30 se muestra el resultado de estas pruebas.

Resultados

| Reactivo | Condición A | Condición B | Condición C | Condición D | Condición E |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Buffer 5x | 6.4 | 6.4 | 6.4 | 6.4 | 6.4 |
| Mg ⁺⁺ 25mM | 2.3 | 2.5 | 2.6 | 3 | 2.2 |
| dNTPs 2.5mM | 2.3 | 2.5 | 2.6 | 3 | 2.2 |
| RD1.1 (12.5µM) | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 |
| RD4.2 (12.5µM) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| RD9.2 (12.5µM) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| RD12.3 (12.5µM) | 2.2 | 2.2 | 2.2 | 2.2 | 2.2 |
| ITS(12.5µM) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| c-lec (9µM) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| BSA 25x | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| c-lec (0.1 ng/µl) | 1.5 | 1.3 | 2 | 2.5 | 1 |
| Taq 5U/µL | 0.3 | 0.3 | 0.4 | 0.4 | 0.2 |
| ADN | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Total (µL) | 31 | 31 | 32 | 33.3 | 30 |

Tabla 20: Optimización de la PCR multiplex. Posibles combinaciones de reactivos

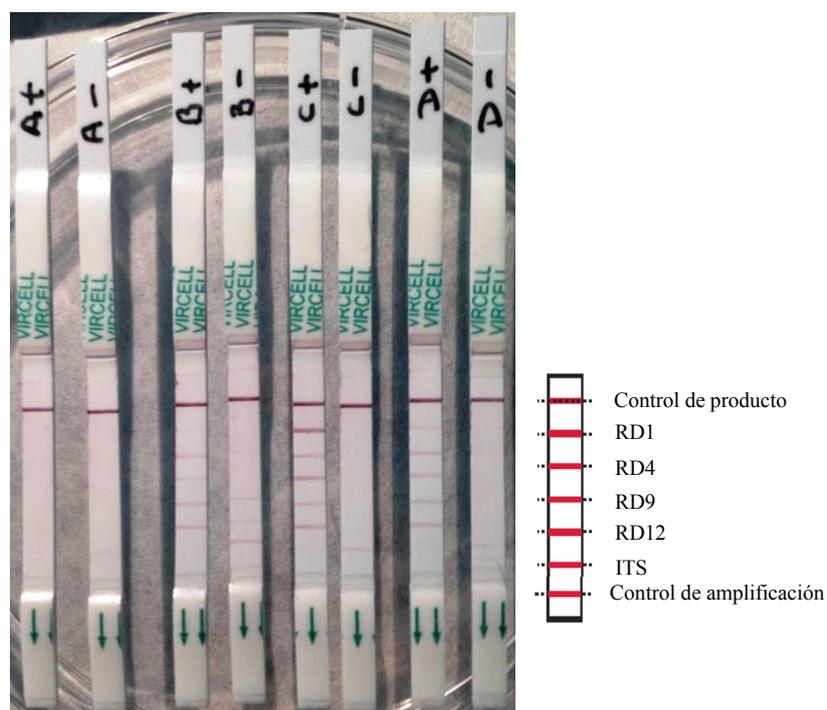


Figura 29: Resultado de las pruebas para la optimización de la PCR multiplex. Condiciones A-D con *M.tuberculosis*

En la condición A hubo una inhibición de la PCR por causas desconocidas. En la condición B no se apreciaba la amplificación de la región RD1. La condición C es la que mejores resultados se obtenían a pesar de no detectarse el control interno cuando el resto de las PCRs eran positivas. En la condición D, la intensidad de la línea correspondiente a RD1 era muy débil.

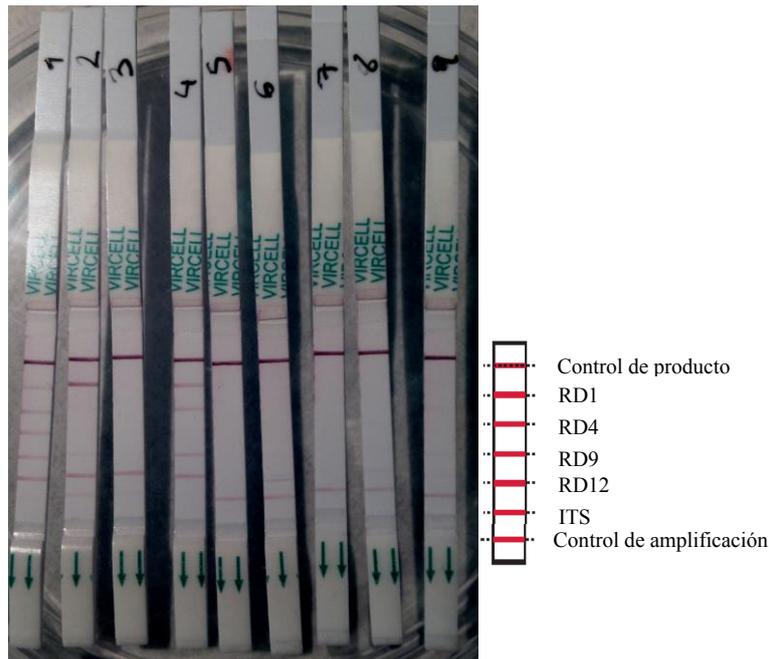


Figura 30: Resultado de las pruebas para la optimización de la PCR multiplex. Condición E. 1.
 1. *M.tuberculosis*, 2. *M.bovis*, 3. *M.bovis* BCG, 4. *M.africanum*, 5. *M.kansasii*, 6. *M.chelonae*, 7. *M.abscessus*,
 8. *Nocardia spp.*, 9. Control negativo

En esta condición se varió fundamentalmente la cantidad de magnesio, Taq y dNTPs, dejando los cebadores con la misma cantidad que las condiciones anteriores. En la imagen podemos observar que esta combinación de reactivos funcionó bien

En sucesivas pruebas se modificó la cantidad de cebadores y otros aditivos así como el programa de amplificación (imagen no disponible) hasta conseguir una señal en la tira de reacción lo más intensa posible. De éste modo se consiguió unificar las diferentes reacciones individuales en una sola con las condiciones que se detallan en la Tabla 11 (de materiales y métodos).

4.2.5 Visualización de productos amplificados con la PCR multiplex: hibridación en tira

Para la visualización de los productos generados a partir de la PCR multiplex con el formato Speed Oligo® se llevó a cabo en primer lugar una desnaturalización durante 2 minutos a 95°C seguida de una hibridación en tira con las sondas correspondientes

según se detalla en el apartado 3.1.5 de materiales y métodos. Los resultados obtenidos se observan en la Figura 31

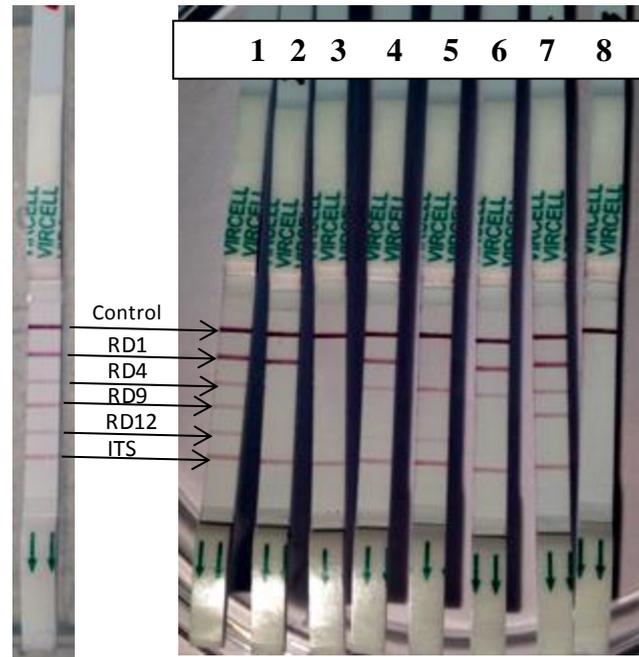


Figura 31: Detección en tira de nitrocelulosa de los productos amplificados en la PCR multiplex

1. *M.tuberculosis*, 2. *M.bovis*, 3. *M.bovis BCG*, 4. *M.africanum*, 5. *M.microti*, 6. *M.caprae*,
7. *M.canettii* 8. Control negativo

4.3 Validación del SO-MTBC

4.3.1 Estudio de las cepas seleccionadas con SO-MTBC

Se analizaron 214 cepas obtenidas de muestras clínicas de pacientes con solicitud de estudio de micobacterias que se habían conservado a -20°C tras su aislamiento en medio de cultivo líquido y/o sólido durante el periodo de Enero 2011-Diciembre 2014. De ellas 189 (88%) estaban previamente identificadas como *M.tuberculosis* complex y 25 (12%) eran diferentes especies de MNT y otras bacterias relacionadas con el género *Mycobacterium* (Tabla 12 de materiales y métodos). Para el procedimiento del ensayo SO-MTBC las cepas se sometieron a un procedimiento de extracción de ADN siguiendo lo descrito en el apartado 3.2.4 (materiales y métodos).

Tras la amplificación, desnaturalización e hibridación en tiras de nitrocelulosa del SO-MTBC, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- Miembros de MTBC: Las 189 cepas analizadas se distribuyeron según muestra el Gráfico 3: el 92% (174) de las cepas del complejo analizadas fueron

Resultados

M.tuberculosis; el 3,7% (7) corresponde a *M.bovis*; un 2,6% (5) fueron *M.bovis* BCG; 1,1% (2) *M.africanum* y 0,5% (1) *M.caprae*. Entre todas las cepas analizadas no se encontró ninguna especie de *M.microti* ni *M.canettii*.

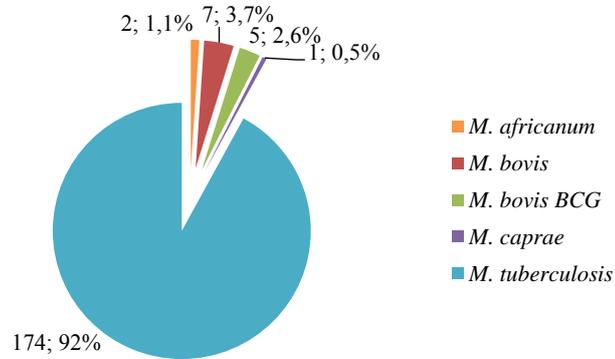


Gráfico 3: Distribución de las especies del complejo *M.tuberculosis* en las cepas clínicas analizadas n=189

- Cepas MNT y cepas de otros géneros relacionados: En ningún caso se obtuvo señal de amplificación en el SO-MTBC.

4.3.2 Comparación de resultados obtenidos en SO-MTBC con GenoType® MTBC

De manera paralela a la realización del SO-MTBC, se realizó el kit GenoType® MTBC a partir del mismo ADN extraído y siguiendo el procedimiento detallado en el apartado 3.3.7 de materiales y métodos. Se realizó una selección aleatoria teniendo en cuenta el número mínimo de cepas a testar para conseguir una correlación estadística adecuada. Por ello, se estudiaron con GenoType® MTBC (ver Figura 32):

- Una muestra aleatoria de cepas identificadas como *M.tuberculosis* por SO-MTBC (n=75).
- Todas las cepas identificadas como *M.bovis*, *M.bovis* BCG, *M.africanum* y *M.caprae* por SO-MTBC (n=15).

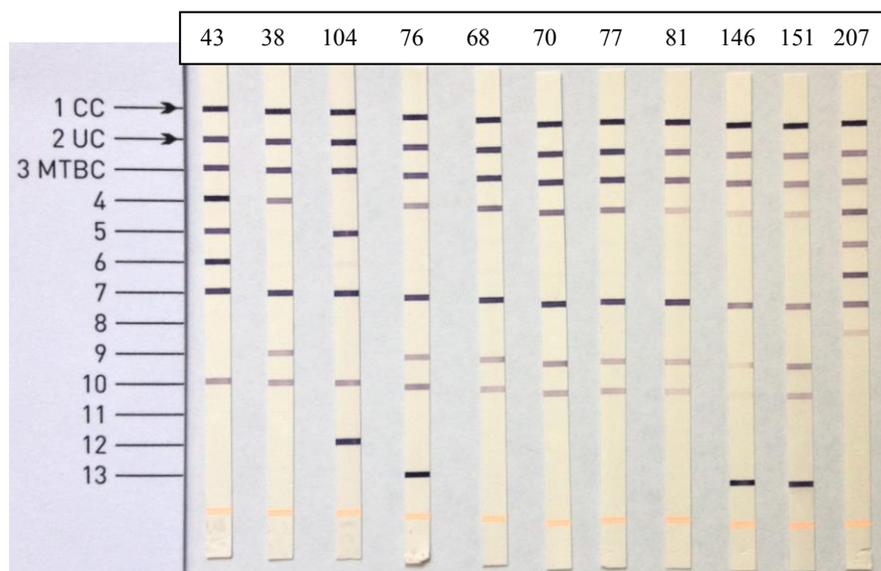


Figura 32: Tiras de GenoType® MTBC de las cepas 43(*M. africanum*)-38 (*M. bovis* subsp. *bovis*)-104 (*M. bovis* subsp. *caprae*)-76 (*M. bovis* BCG)-68 (*M. bovis* subsp. *bovis*)-70(*M. bovis* subsp. *bovis*)-77(*M. bovis* subsp. *bovis*)-81(*M. bovis* subsp. *bovis*)-146(*M. bovis* BCG)

La concordancia entre ambos kit diagnósticos medida con el índice Kappa de Cohen fue de 0,9589 con un IC del 95%. Se encontró una cepa discrepante que fue identificada como *M.africanum* con SO-MTBC y como *M.tuberculosis* con GenoType® MTBC. Para resolver esta discrepancia se realizó la secuenciación del gen *hsp65* siguiendo el procedimiento descrito por otros autores anteriormente^{27,151}. Además el ADN de la cepa se envió al Centro Nacional de Microbiología (Majadahonda, Madrid, España) para estudio a nivel de especie, identificándola como *M.tuberculosis*. Los resultados obtenidos mediante la secuenciación del gen *hsp65* no fueron concluyentes.

4.4 Estudio descriptivo de los casos de tuberculosis

4.4.1 Incidencia de tuberculosis

En el área sanitaria que corresponde al HUVN, se diagnosticaron 297 casos de tuberculosis durante el periodo de estudio (de enero de 2011 a diciembre de 2014), lo que corresponde a una tasa de incidencia anual media de 22,40 casos por 100.000 habitantes en dicho periodo (incidencia calculada a partir de datos de población con tarjeta sanitaria individual (TIS)). La evolución de dicha incidencia se muestra en el Gráfico 4. En el año 2011 hubo 79 casos (23,96/100.000 habitantes), en 2012 hubo 61 casos (18,01/100.000 habitantes), en 2013 hubo 80 casos (23,76/100.000 habitantes) y

en 2014 hubo 77 casos (22,99/100.000 habitantes). Cabe recordar que los pacientes diagnosticados de tuberculosis no solo fueron los casos confirmados por microbiología, sino también aquellos casos con diagnóstico anatómo-patológico compatible y los que presentaban clínica y radiología compatibles con tuberculosis y se les prescribió una pauta completa de tratamiento antituberculosa.

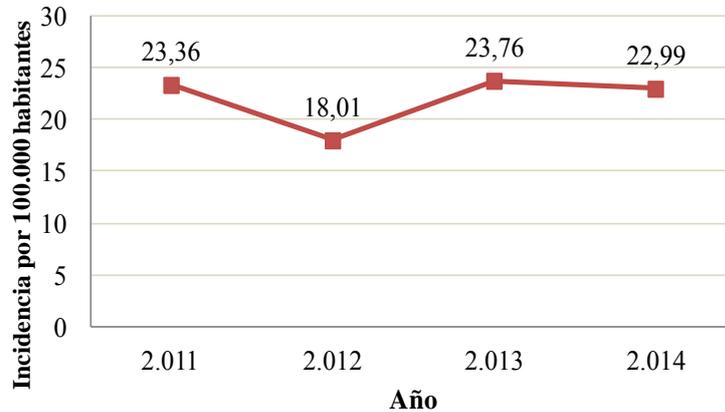


Gráfico 4: Evolución de la tasa de incidencia de tuberculosis durante el periodo de estudio 2011-2014

4.4.2 Características socio-demográficas de los pacientes: edad, sexo y nacionalidad

La edad media de los pacientes diagnosticados de tuberculosis en el área sanitaria correspondiente al HUVN durante el periodo de estudio (2011-2014) fue de 41 años [1-91] con una desviación típica de 20,76 y distribuidos según muestra el Gráfico 5. En cuanto al sexo, el 38,05% (113) de los pacientes fueron mujeres mientras que el 61,95% (184) fueron hombres (Gráfico 6).

Resultados

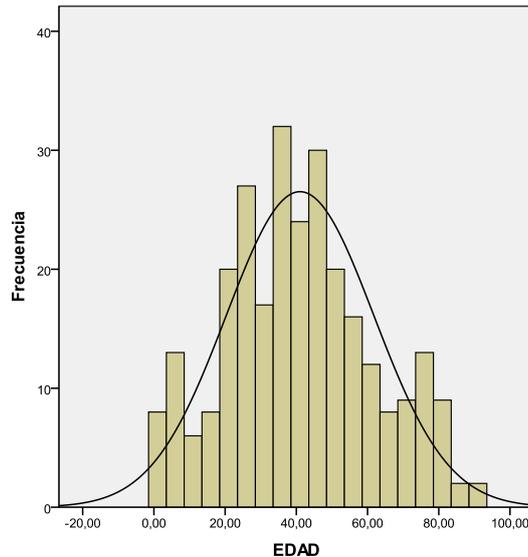


Gráfico 5: Distribución por edad de los pacientes con tuberculosis (N=297)

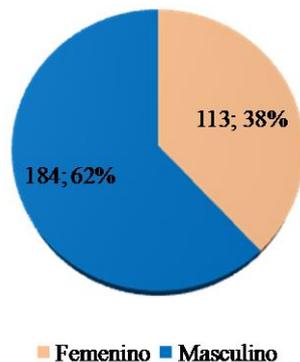


Gráfico 6 : Distribución por sexo de los pacientes con tuberculosis n (%) N=297

Los pacientes españoles representaron un 74,07% (220) del total. El restante 25,93% (77) eran extranjeros (Gráfico 7). Los principales países de origen inmigrante fueron: Marruecos 31,17% (24); Rumanía 18,18% (14) y Senegal 16,88% (13). Entre éstos tres países suman el 66,23% de los pacientes extranjeros. A éstos, le siguen Bolivia con un 7,79% (6) y China con 3,9% (3) de los pacientes extranjeros. En menor proporción se encuentran países como Brasil, Mali, Pakistán y Rusia con 2 pacientes cada uno (2,6%). Y finalmente se diagnosticó un caso por cada uno de los siguientes países: Bulgaria, Camerún, Ecuador, Francia, Lituania, Polonia, Reino Unido, República Dominicana y Venezuela (Gráfico 8)

Resultados

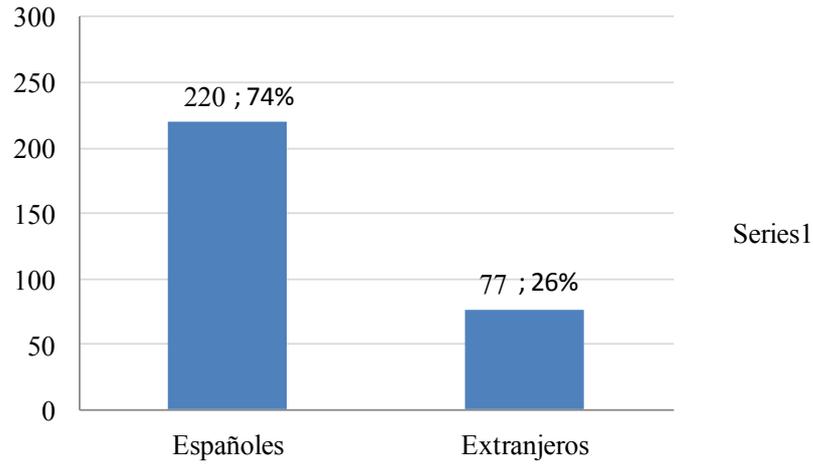


Gráfico 7: Distribución por procedencia de los pacientes con tuberculosis (n=297)

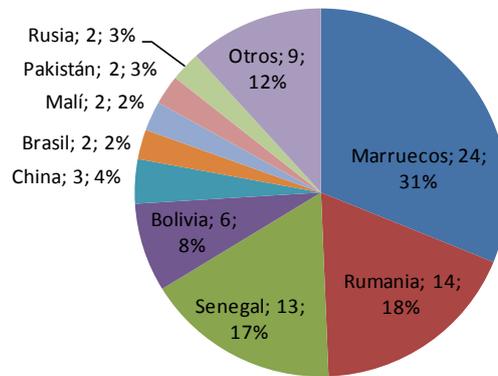


Gráfico 8: País de origen de los pacientes extranjeros (n=77)

Otros: Bulgaria, Camerún, Ecuador, Francia, Lituania, Polonia, Reino Unido, República Dominicana y Venezuela

4.4.3 Características clínico-epidemiológicas de los pacientes con tuberculosis

Del total de casos, 229 (77,10%) corresponden a tuberculosis respiratoria y 68 (22,90%) a tuberculosis de otras localizaciones (Gráfico 9) las cuales están descritas en la Tabla 22. La distribución de los casos según el año esta detallada en la Tabla 21

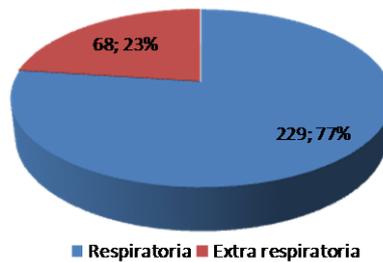


Gráfico 9: Localización de la infección en los pacientes con tuberculosis n=297

| AÑO | TB Respiratoria | TB Extra respiratoria |
|------|-----------------|-----------------------|
| 2011 | 61 | 18 |
| 2012 | 48 | 13 |
| 2013 | 61 | 19 |
| 2014 | 59 | 18 |

Tabla 21: Distribución de los casos de tuberculosis según año y forma clínica de presentación

Un 48,48% (144) de los pacientes fueron hospitalizados a causa de la tuberculosis con una estancia media de 15 días de ingreso. Cabe destacar que la media de estancia hospitalaria en pacientes con tuberculosis extrarrespiratoria es superior a los pacientes ingresados con tuberculosis respiratoria. Con respecto a la situación evolutiva de los enfermos, la mayoría de ellos (230; 77,44%) fueron casos iniciales; 20 (6,73%) fueron recidivas y 3 (1,01%) eran pacientes que habían iniciado y abandonado el tratamiento en varias ocasiones; el resto de pacientes eran de evolución desconocida.

| Forma clínica | Frecuencia | Porcentaje |
|-----------------|------------|------------|
| Pulmonar | 210 | 70,71 |
| Pleural | 22 | 7,41 |
| Osteoarticular | 18 | 6,06 |
| Linfática | 16 | 5,39 |
| Genitourinarias | 11 | 3,70 |
| Otra | 8 | 2,69 |
| Digestiva | 4 | 1,35 |
| Diseminada | 4 | 1,35 |
| Meningitis | 4 | 1,35 |
| Total | 297 | 100 |

Tabla 22: Formas clínicas de los casos de tuberculosis

El diagnóstico radiológico se mostró con normalidad en el 9,76% (29) de los pacientes y no se realizó y/o no quedó constancia de ello en 78 (26,26%) pacientes. El resto fueron radiografías de tórax anormales, en la que predomina la situación de ausencia de cavitación en 125 pacientes (42,09%) frente a la cavitación en 65 (21,89%) enfermos, como muestra el Gráfico 10

Resultados

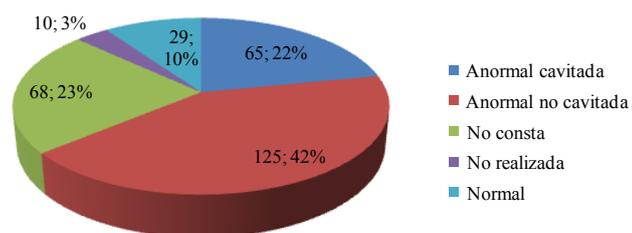


Gráfico 10: Resultados de la radiografía de tórax de los pacientes con tuberculosis n=297

4.4.3.1 Factores de riesgo y otras situaciones especiales

El 47,81% (142) de los pacientes tenían al menos un factor de riesgo relacionado con el desarrollo de tuberculosis. Los más frecuentemente encontrados fueron el alcoholismo, tabaquismo, coinfección con el virus VIH, toxicomanías, diabetes inestable, adicción a drogas por vía parenteral (ADVP) y otras causas. La frecuencia y distribución de estos factores de riesgo se muestra en la Tabla 23. El resto de los pacientes (155; 52,19%) no tenían ningún factor de riesgo conocido o bien no constaba este dato en su historia.

| Factor de riesgo | Frecuencia | Porcentaje |
|--------------------------------|-------------------|-------------------|
| Ninguno conocido | 155 | 46,13 |
| Otras | 29 | 8,63 |
| Alcoholismo | 23 | 6,85 |
| Tabaquismo | 22 | 6,55 |
| VIH/SIDA | 15 | 4,46 |
| Otras toxicomanías | 14 | 4,17 |
| Diabetes inestable | 12 | 3,57 |
| UDVP | 12 | 3,57 |
| Terapia inmunosupresora | 11 | 3,27 |
| EPOC | 7 | 2,08 |
| Inmunodeficiencias | 6 | 1,79 |
| Desnutrición | 5 | 1,49 |
| I.R.C* | 5 | 1,49 |
| VHC | 5 | 1,49 |
| Carcinoma vejiga | 3 | 0,89 |
| Diabetes | 3 | 0,89 |
| VHB | 3 | 0,89 |
| Politoxicomanía | 2 | 0,60 |
| Cirrosis hepática | 2 | 0,60 |
| Alcoholismo | 1 | 0,30 |
| Linfoma | 1 | 0,30 |
| Total | 336 | 100 |

Tabla 23: Factores de riesgo encontrados en los pacientes con tuberculosis

*I.R.C: Insuficiencia renal aguda

Además de los factores de riesgo detallados previamente, cabe destacar algunas situaciones especiales como que 55 pacientes (18,51%) eran inmigrantes, 18 pacientes (6,06%), estaban internos en prisión, 14 (4,71%) eran casos especiales (por diversas causas), 6 (2,02%) residían en otra institución cerrada, 6 (2,02%) eran educadores, 6 (2,02%) pacientes habían sido vagabundos durante el último año, 2 (0,67%) eran trabajadores sanitarios y otros 2 (0,67%) trabajadores de la hostelería.

4.4.3.2 Estudios de contactos

Se realizó estudio de contactos en 132 ocasiones sumando un total de 1086 contactos estudiados. El resultado de dichos estudios fue de 664 (61,2%) contactos no infectados, 251 (23,1%) contactos infectados y 25 (2,3%) contactos enfermos. Del resto (146; 13,4%) se desconoce el resultado del estudio.

4.4.3.3 Tratamiento

El 57,91% (172) de los pacientes recibieron como tratamiento para la tuberculosis INH, RIF, Z y E. Tras esta pauta, la más frecuentemente utilizada fue la estándar (INH+RIF+Z), que fue prescrita en 71 pacientes (23,91%). El resto de las pautas de tratamiento recibidas por los pacientes pueden observarse en el Gráfico 11.

Del total de los pacientes, se tiene constancia de dos casos en los que no se llevó a cabo el tratamiento debido al fallecimiento del paciente; en un caso debido a la tuberculosis y en otro caso debido a causas no infecciosas.

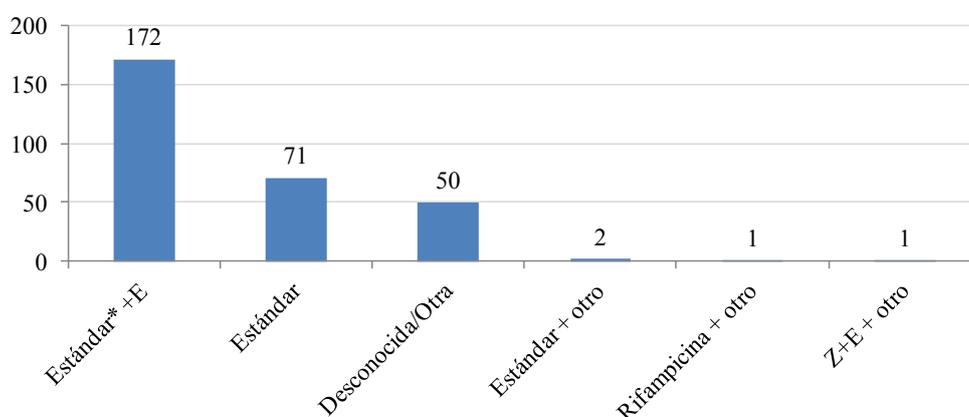


Gráfico 11: Pautas de tratamiento establecidas a los pacientes con tuberculosis n=297

*Estándar= I+R+P

Con respecto a la duración del tratamiento antituberculoso, las pautas más frecuentemente prescritas fueron la de 6 meses (165; 55,56%), seguida de 9 meses (21; 7,07%) y 12 meses (20; 6,73%). El resto de pautas que recibieron los pacientes vienen detalladas en la Tabla 24 y corresponden a casos de tuberculosis extrarrespiratoria.

| Duración en meses | Frecuencia | Porcentaje |
|-------------------|------------|------------|
| 5 | 1 | 0,3 |
| 6 | 165 | 55,6 |
| 7 | 1 | 0,3 |
| 8 | 2 | 0,7 |
| 9 | 21 | 7,1 |
| 10 | 3 | 1,0 |
| 11 | 2 | 0,7 |
| 12 | 20 | 6,7 |
| 14 | 1 | 0,3 |
| 18 | 2 | 0,7 |
| 20 | 2 | 0,7 |
| No consta | 77 | 25,9 |
| Total | 297 | 100 |

Tabla 24: Pautas de tratamiento antituberculoso

4.4.4 Estudio microbiológico de los pacientes diagnosticados de tuberculosis

De todos los pacientes con diagnóstico de tuberculosis (n=297) en el ámbito de estudio, se recibieron en el laboratorio de Microbiología del HUVN muestras de 205 (69%) pacientes (Tabla 25). El resto de los pacientes (92; 31%) obtuvieron el diagnóstico por otros criterios (clínicos, anatomopatológicos y/o radiológicos) o se les realizó el estudio microbiológico en otros centros. Las muestras que se enviaron eran de diferentes localizaciones siempre siendo reflejo del lugar afectado (Gráfico 12) y en diferentes ocasiones se enviaron más de una muestra por paciente de igual o distinta localización anatómica. Para éste estudio solo se ha considerado una muestra por paciente, la más representativa de su proceso infeccioso y/o la que se obtuvo como resultado del cultivo la cepa de *M.tuberculosis* complex. Tal como cabía esperar la muestra más frecuentemente sometida a estudio micobacteriológico fue el esputo espontaneo 167 (61,95%). En la mayoría de las ocasiones la muestra para estudio microbiológico procedía del servicio de Urgencias hospitalarias, aunque otros servicios como Respiratorio y Medicina Interna destacan sobre otras procedencias menos frecuentes. Cabe destacar la presencia del Centro penitenciario y diversos centros de Salud adscritos al HUVN como demandantes de este tipo de estudios (Gráfico 13).

| | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | Total |
|-----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| HUVN* | 57 | 47 | 53 | 48 | 205 |
| Sin datos microbiológicos en HUVN | 22 | 14 | 27 | 29 | 92 |
| Total casos declarados | 79 | 61 | 80 | 77 | 297 |

Tabla 25: Muestras recibidas para estudio microbiológico de los pacientes diagnosticados de tuberculosis

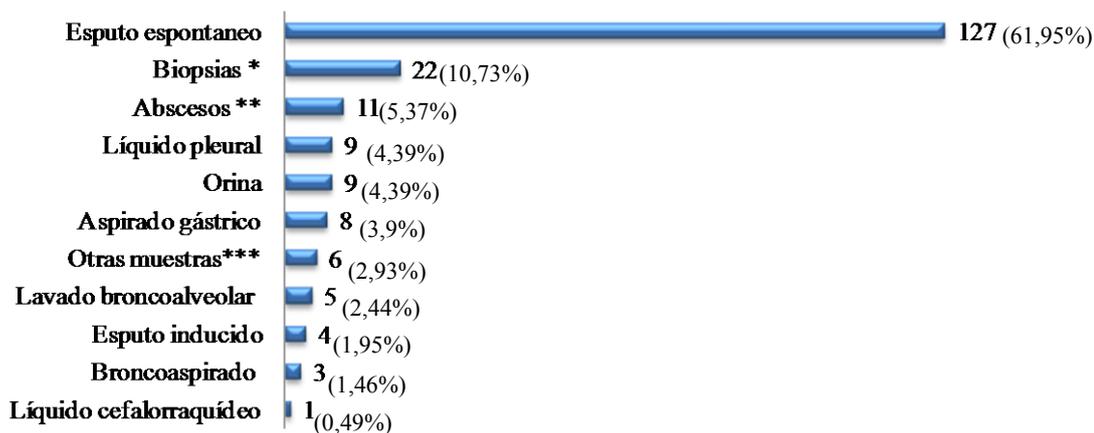


Gráfico 12: Tipo de muestras enviadas al laboratorio para estudio de tuberculosis (n=205)

**Biopsias: adenopatía (6), colon (2), pleural (4), pulmonar (1), ósea (6) y otras (3)

** Abscesos: cervicofacial (1), hepático (1), torácico (2), vertebral (2) y otros (5)

*** Otras muestras: aspirado otro (2) Drenaje pleural (1), exudado de herida (1), hemocultivo (1) y otras muestras (1)



Gráfico 13: Procedencia de las muestras para estudio de tuberculosis (n=205)

*Otras: Anestesia y reanimación, Cardiología, Cirugía general, Cirugía maxilofacial, Digestivo, Microbiología, Nefrología, Neurocirugía, Oncología, Otorrinolaringología, Radiodiagnóstico, Unidad de Cuidados Intensivos.

**Otros Hospitales: Hospital General de Baza (13), Hospital San Cecilio (4)

Resultados

De las muestras recibidas en el laboratorio de Microbiología de pacientes diagnosticados de tuberculosis, 157 (77%) fueron cultivo positivo de MTBC; 21 (10%) muestras fueron cultivo negativo pero PCR frente a MTBC positiva y las restantes 27 (13%) fueron negativas por ambos métodos (Gráfico 14). Por tanto, el laboratorio de Microbiología del HVN confirmó 178 (60%) de los casos diagnosticados en el Área Norte de Granada mediante aislamiento de la cepa en cultivo o mediante la presencia de ADN de la micobacteria en la muestra clínica. El resto de los casos (119; 40%) fueron diagnosticados con criterios microbiológicos en otro centro sanitario o bien obtuvieron el diagnóstico mediante otros criterios (sin confirmación microbiológica de la infección).

La baciloscopia de las muestras recibidas en el laboratorio de Microbiología de pacientes diagnosticados de tuberculosis (n=205) fue positiva en un 52% (107) de las muestras frente al 48% (98) que resultó ser negativa.

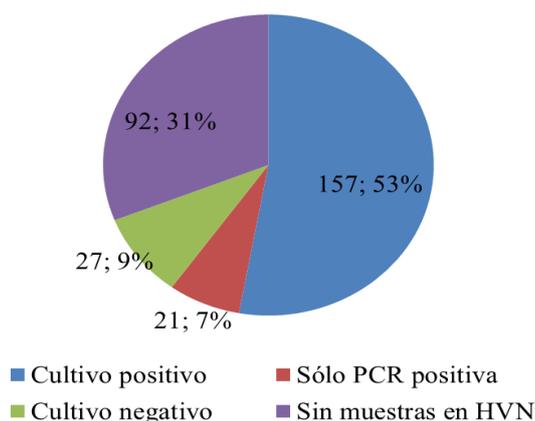


Gráfico 14: Resultados microbiológicos de las muestras de los pacientes diagnosticados de tuberculosis (n=297)

Con respecto al número de cepas testadas en el laboratorio mediante estudios fenotípicos se encontró un 5,1% (n=156) de resistencia a estreptomycin, 1,9% (n=159) de resistencia a isoniazida, 0,62% (n=1) de resistencia a rifampicina, 1,9% (n=158) de resistencia a etambutol y un 7,79% (n=154) de resistencia a pirazinamida (Tabla 26). La cepa resistente a rifampicina lo era también a isoniazida y a estreptomycin. Las especies resistentes a pirazinamida fueron: 5 *M.bovis*, 4 *M.bovis* BCG y 3 *M.tuberculosis*.

Resultados

| | Estreptomicina | Isoniazida | Rifampicina | Etambutol | Pirazinamida |
|-----------------------|-----------------------|-------------------|--------------------|------------------|---------------------|
| Sensible | 148 | 156 | 159 | 155 | 142 |
| Resistente | 8 | 3 | 1 | 3 | 12 |
| Cepas testadas | 156 | 159 | 159 | 158 | 154 |
| % resistencia | 5,13 | 1,89 | 0,62 | 1,90 | 7,79 |

Tabla 26: Sensibilidad de las cepas analizadas en el laboratorio

A partir del año 2012 también se realizaron estudios genotípicos de resistencia a I y R con GenoType® MTBDR plus (Hain Lifescience). De las 44 cepas testadas por este método solo en una de ellas (0,22%) se detectaron mutaciones de resistencia a isoniazida y en ningún caso se detectaron mutaciones de resistencia a rifampicina. La resistencia detectada a isonizida por métodos moleculares fue confirmada por métodos fenotípicos. El resto de cepas resistentes a INH y RIF por métodos fenotípicos no fueron testadas por métodos moleculares.

► DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1 Evaluación del SO-DMT para la detección directa de micobacterias en muestras clínicas respiratorias.

Clásicamente, el diagnóstico microbiológico de la tuberculosis se ha basado en la microscopía, el cultivo y la identificación fenotípica. La baciloscopia es el método más rápido, sencillo y económico disponible pero su baja sensibilidad ha limitado su utilidad, especialmente en las zonas geográficas de menor incidencia de la enfermedad y en las formas extrapulmonares de la tuberculosis. El cultivo sigue siendo el método de referencia por permitir acceder a estudios posteriores con el aislado micobacteriano (identificación, sensibilidad y tipificación epidemiológica)^{6,152} sin embargo, la lentitud de crecimiento del bacilo tuberculoso representa el mayor inconveniente para un diagnóstico rápido de la enfermedad. Por todo esto, en los últimos años se han desarrollado nuevos métodos para el diagnóstico rápido de la tuberculosis activa basándose en técnicas de biología molecular^{6,128}. La detección directa de *M. tuberculosis* en la muestra clínica hace posible una intervención epidemiológica y el tratamiento precoz de la enfermedad. Se han evaluado numerosos ensayos de detección directa de *M.tuberculosis* en muestras clínicas respiratorias basados en amplificación de ácidos nucleicos comerciales, mostrando una alta especificidad y un buen valor predictivo positivo para muestras con baciloscopia positiva y una sensibilidad variable para muestras con baciloscopia negativa y muestras extrapulmonares¹⁵³⁻¹⁵⁶. Por ello, las técnicas de PCR frente a *M.tuberculosis* complex de muestra directa están siendo introducidas actualmente en los laboratorios clínicos para el análisis de muestras de rutina ya que en los últimos años han demostrado su utilidad en distintas publicaciones científicas.

La tecnología ensayada en este estudio combina el método de amplificación de PCR con un sistema de detección simple que no requiere equipos exclusivos ni mucho proceso de manipulación en el desarrollo del procedimiento de la técnica. Como limitaciones señalar que no es posible la automatización del ensayo y la necesidad de varias áreas en el laboratorio para el procesamiento (para la preparación de la muestra, amplificación de la diana y detección de los amplicones). En la evaluación del SO-DMT se observó que

en las muestras con baciloscopia positiva la concordancia entre la microscopía y el resultado del SO-DMT fue muy buena. La sensibilidad del test en estas muestras fue satisfactoria y diferenció correctamente las micobacterias pertenecientes al complejo *M.tuberculosis* de las no tuberculosas en todos los casos. Sin embargo, en muestras con baciloscopia negativa la sensibilidad encontrada fue menor (56,6%) aunque similar a los rangos de sensibilidad encontrados en otros estudios en muestras no bacilíferas^{155,157}. En muestras con MNT, la sensibilidad fue baja (3/10) probablemente debido a la baja carga bacilar de micobacterias en estas muestras, ya que la mayoría de ellas no eran bacilíferas. No se produjo ninguna reacción cruzada con diferentes microorganismos similares al género *Mycobacterium* y la especificidad de forma global fue alta (99%) demostrando la utilidad del test para diferenciar micobacterias pertenecientes al complejo *M.tuberculosis* de MNT en muestras con baciloscopia positiva. A pesar de ello se encontraron discrepancias entre los resultados del SO-DMT y los datos clínicos. En alguna muestra se detectó ADN para el género *Mycobacterium* en SO-DMT pero posteriormente no creció ninguna micobacteria en el cultivo; una posible explicación para este hecho es la inviabilidad de la micobacteria¹⁵³. Por otro lado, un resultado negativo del SO-DMT en una muestra con cultivo positivo puede deberse a la presencia de muy baja carga bacilar, a una distribución desigual de la micobacteria en la muestra o a la ineficiencia del proceso de lisis de la pared celular. Según los datos aportados por el fabricante, la sensibilidad analítica del SO-DMT para la línea de *M.tuberculosis* complex es de 2 copias del genoma por reacción y para la línea del test del género *Mycobacterium* es de 20 copias del genoma por reacción¹⁴⁶.

Otro kit comercial similar al SO-DMT es el GenoQuick MTB (Hain Lifescience, Nehren, Germany). Moure y col.¹⁵⁸ realizaron en 2012 una evaluación del GenoQuick MTB con 96 muestras con MTBC y 15 con MNT comparando los resultados obtenidos con el cultivo y la baciloscopia de las muestras. GenoQuick identificó correctamente el 85,4% (82/96) de las muestras que contenían *M.tuberculosis* complex (100% de las muestras con baciloscopia positiva y 78,1% muestras con baciloscopia negativa). Una muestra que contenía una MNT (*M.fortuitum*) fue identificada como *M.tuberculosis*. y el resto de las muestras con MNT fueron negativas para *M.tuberculosis*. Por ello concluyen que es un buen método (rápido sencillo y barato) de detección directa de *M.tuberculosis* en muestras clínicas; incluso en muestras con baciloscopia negativa.

El test Abbott Real Time MTB (Abbott Laboratories. Abbott Park, Illinois, U.S.A)¹⁵⁹ detecta la presencia de ADN de los ocho miembros del complejo *M.tuberculosis* con una sensibilidad del 93% en muestras con cultivo positivo (99% en muestras con baciloscopia positiva y 81% en muestras con baciloscopia negativa) y una especificidad del 97%.

El test Xpert MTB/RIF (Cepheid) es la prueba de diagnóstico rápido basada en una PCR anidada a tiempo real recomendada por la OMS, siendo el primer sistema cerrado de este tipo. Además de detectar la presencia de *M.tuberculosis* en la muestra, el sistema es capaz de detectar mutaciones en el gen *rpoB* indicando resistencias a nivel genotípico a la rifampicina. Para muestras respiratorias tiene una sensibilidad del 93,8% (99,7% en muestras con baciloscopia positiva y 76,1% en muestras con baciloscopia negativa) y una especificidad del 98,7% en comparación con el cultivo. Moure y col. utilizaron el Xpert MTB/RIF en muestras extrarrespiratorias¹⁶⁰ y como cabía esperar la sensibilidad fue menor aunque la especificidad fue del 100%. La sensibilidad global fue del 58,3% aunque encontraron grandes diferencias en función del tipo de muestra. Para las muestras solidas se obtuvo un 76,5% de sensibilidad y para muestras líquidas de localizaciones estériles la sensibilidad fue bastante menor (en líquidos pleurales 26,9%). A pesar de estos datos la utilización de Xpert MTB/RIF para la detección de *M.tuberculosis* en muestras extrarrespiratorias puede ser una herramienta útil sobre todo en pacientes con alta sospecha clínica.

Fluorotype® MTB (Hain Lifescience) es un ensayo cualitativo in vitro para la detección del complejo *M.tuberculosis* directamente a partir de muestras clínicas pulmonares y extrapulmonares descontaminadas. La detección de producto de amplificación se realiza mediante la medida de una señal de fluorescencia. En el estudio de Hofmann y colaboradores¹⁶¹ demostró una sensibilidad del 100% en muestras respiratorias con baciloscopia positiva y 56,3% en muestras respiratorias con baciloscopia negativa.

Un reciente metaanálisis¹⁵⁵ que incluyó 125 estudios evaluó el rendimiento diagnóstico de las pruebas comercializadas de amplificación de ácidos nucleicos comparado con el cultivo para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar a partir de muestras respiratorias. La sensibilidad global fue del 85% (IC95% 0,847 a 0,86) y la especificidad del 96,8% (IC95% 0,967 a 0,969). Aunque estos métodos tienen como ventaja la rapidez de los resultados, el rendimiento diagnóstico no es del todo deseable. Las pruebas aplicadas en

muestras de secreción respiratoria (inducida o a través de broncoscopia) tuvieron un rendimiento significativamente superior a las aplicadas en muestras de esputo. Estos métodos de amplificación de ácidos nucleicos presentan su máximo rendimiento en las muestras con un abundante contenido bacilar.

Una diferencia entre los distintos sistemas comerciales es la diana de amplificación que utilizan; entre ellas: IS6110, *rpoB*, proteína antigénica B, ARNr 16S, ARNr 23S u otros fragmentos de ADN específicos para el complejo *M.tuberculosis* variando entre estos sistemas los valores de sensibilidad y especificidad.

Un punto limitante de este tipo de técnicas en las que se parte de muestra directa es la extracción de ácidos nucleicos. Es fundamental conseguir un contenido adecuado de ADN para mejorar la eficiencia de las técnicas y evitar perder sensibilidad¹⁶². Las micobacterias poseen una pared celular gruesa que dificulta la extracción de ácido nucleicos, por ello se han realizado estudios sobre la influencia del método de extracción en la calidad del material genético obtenido. De Almeida y col.¹⁶³ evaluaron diferentes métodos de extracción y obtuvieron resultados muy diferentes entre los distintos métodos.

Por tanto el sistema evaluado en este estudio (SO-DMT), ha mostrado unos datos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo similares a los comentados anteriormente para otras técnicas moleculares. El formato Speed Oligo® hace a esta técnica accesible para cualquier laboratorio que tenga equipamiento básico siendo posible obtener un resultado en menos de 2 horas con escaso tiempo de manipulación de la muestra. Además a diferencia de otros sistemas es capaz de detectar la presencia de MNT. Por otro lado, la baja sensibilidad que ha mostrado el SO-DMT en muestras con baciloscopia negativa hace necesaria que la interpretación de los resultados obtenidos se complete con otros datos clínicos y microbiológicos del paciente; del mismo modo que ocurre con la detección de ADN de MNT.

5.2 Diseño y validación del SO-MTBC para la identificación de los miembros del complejo *M.tuberculosis*

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* comprende principalmente las siguientes especies patógenas humanas: *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.bovis* BCG, *M.africanum*, *M.caprae*, *M.microti* y *M.canettii*. El conocimiento de la especie del complejo implicada en un proceso infeccioso es dificultoso porque comparten un 99,9% de identidad genética entre ellas, pero llegar a este nivel de identificación puede ofrecer numerosos avances a nivel epidemiológico y expectativas de mejora del tratamiento. En primer lugar facilita el correcto establecimiento de la terapia antibiótica ya que no todas las especies del complejo *M. tuberculosis* tienen la misma sensibilidad a los antituberculosos, como en el caso de *M. bovis*, que es resistente de forma natural a la pirazinamida. En segundo lugar, desde el punto de vista epidemiológico ayudar a identificar más rápidamente las situaciones de brote y a su control por ejemplo en la transmisión de *M. bovis* entre los productos animales y los seres humanos facilitando del mismo modo los estudios de contactos. En tercer lugar puede ayudar a identificar los efectos secundarios graves del tratamiento con *M. bovis* BCG en pacientes con cáncer de vejiga y en otros pacientes inmunocomprometidos. Estos y otros motivos hacen que se estén realizando investigaciones dirigidas a llegar a este nivel de especiación. La identificación de las especies que forman parte del complejo ha estado clásicamente basada en el análisis de un número muy limitado de métodos fenotípicos. Pero debido al lento crecimiento de estos microorganismos, la interpretación de los resultados puede ser subjetiva, especialmente la que se refiere a las características morfológicas que pueden variar debido a la pérdida de virulencia o debido a mutaciones asociadas a la resistencia a fármacos, lo que puede producir errores en la identificación⁶⁰. El principal problema para llegar a esta especiación deriva de la similitud genética entre las micobacterias del complejo dificultando el empleo de técnicas moleculares. Poseen una homología superior al 95% en la hibridación ADN-ADN, tienen idénticas secuencias en los genes *rpoB*, rARN 16S y en el espacio intergénico de los genes 16S y 23S y sólo la subespecie *M.canettii* difiere en el gen *hsp65*^{62,165,166}. Tienen el mismo perfil lipídico, excepto *M. bovis* BCG, que presenta pequeñas diferencias con el resto de las especies.

Numerosos autores han diseñado técnicas caseras para diferenciar algunas de las especies del complejo basándose en la presencia de deleciones genéticas en el genoma

de las micobacterias con respecto a la cepa *M.tuberculosis* H37Rv^{57,142,143,167,168}, o en la presencia de polimorfismos puntuales en diferentes dianas genéticas (*gyrB*, *katG*, *hsp65*)¹⁶⁹ o utilizando técnicas como RFLP-PCR de *hsp65* o *gyrB*^{151,170} o spoligotyping^{171,172}. Actualmente para poder llegar a este nivel de identificación bacteriana, la única opción comercial disponible es el GenoType® MTBC (Hain Lifescience) que diferencia desde cultivo las siguientes especies/cepas pertenecientes al grupo *M.tuberculosis* complex: *M. tuberculosis*/*M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis subsp. bovis*, *M. bovis subsp. caprae*, y *M. bovis* BCG mediante un procedimiento relativamente sencillo y con una duración aproximada de 5 horas,¹⁷³⁻¹⁷⁵. Este ensayo está basado en la tecnología DNA Strip. El procedimiento completo se divide en tres pasos: (i) extracción de DNA procedente de cultivo (medio sólido/medio líquido), (ii) una amplificación multiplex con cebadores marcados con biotina, y (iii) una hibridación reversa. Las dianas genéticas de este kit son los polimorfismos en el gen *gyrB* y la región de delección RD1 para la identificación de *M.bovis* BCG^{172,176}.

El nuevo kit diseñado, SO-MTBC, permite diferenciar las principales especies patógenas del complejo *M.tuberculosis* (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.bovis* BCG, *M.africanum*, *M.caprae*, *M.microti* y *M.canettii*), aportando una serie de ventajas con respecto al GenoType® MTBC (ver Tabla 27): (i) Permite la diferenciación entre *M.tuberculosis* y *M.canettii*; (ii) No necesita disponer de equipos específicos en el laboratorio (iii) La duración de la técnica es menor. Las dianas genéticas utilizadas difieren de las del GenoType® MTBC aunque la región RD1 se encuentra en ambos sistemas. El resto de RD seleccionadas como dianas para diferenciar el complejo *M.tuberculosis* con SO-MTBC (RD4, RD9 y RD12) han sido utilizadas anteriormente por otros autores^{57,142,143} para este fin, y en ocasiones en combinación con otras regiones genéticas. Entre las dos propuestas de regiones para desmembrar el complejo, la combinación elegida (propuesta n°1) ha demostrado su utilidad para el fin diseñado; siendo capaz de diferenciar entre las siete especies del complejo sin presentar ninguna reacción cruzada con otras MNT ni con otras bacterias relacionadas con el género. La propuesta n°2 fue descartada principalmente por contener la región RD3 para diferenciar *M.tuberculosis* de *M.canettii* y *M.bovis* de *M.bovis* BCG. Como se citó anteriormente el uso de esta región comprende problemas relacionados con la naturaleza propia de esa región (profago) que hace que pueda localizarse en distintas partes del genoma dificultando el hecho de demostrar mediante PCR la delección de este elemento en una

región concreta del genoma. El diseño de los cebadores para las RD seleccionadas en el algoritmo definitivo (nº1) se realizó de acuerdo con la características necesarias para adaptar la fase de detección al formato Speed Oligo®, es decir, teniendo en cuenta factores como el tamaño del amplicón, su contenido en GC y su temperatura *melting*. En cuanto a las condiciones de PCR del SO-MTBC se fueron optimizando hasta conseguir unos resultados óptimos obteniendo amplicones adecuados y evitando la presencia de interferencias en la reacción de amplificación. Las sondas (de captura y detección) diseñadas fueron capaces de detectar los productos de PCR correspondientes y la concentración de la sonda en la tira reactiva se fue adaptando hasta conseguir una señal uniforme de todas las regiones diana. La adaptación de la etapa de detección al formato Speed Oligo® ha aportado grandes ventajas, facilitando en gran medida lectura de los resultados y haciendo posible su uso en laboratorios de rutina sin necesidad de equipos especializados.

| | GenoType® MTBC | SO-MTBC |
|---------------------------------|---|---|
| Duración extracción ADN* | 45-60 min | 90 min |
| | Termociclador | Termociclador |
| Equipamiento necesario | Auto-Lipa | Termobloque |
| Dianas del test | <i>gyrB</i> , RD1 | RD1, RD4, RD9, RD12 e ITS |
| Duración amplificación | 1h 40 min | 1h 35 min |
| Hibridación | Reversa (1h 45min) | Doble (15 min) |
| Especies identificadas | <i>M.tuberculosis</i> , <i>M.bovis</i> , <i>M.bovis</i> BCG, <i>M.africanum</i> , <i>M.caprae</i> y <i>M.microti</i> | <i>M.tuberculosis</i> , <i>M.bovis</i> , <i>M.bovis</i> BCG, <i>M.africanum</i> , <i>M.caprae</i> , <i>M.microti</i> y <i>M.canettii</i> |

Tabla 27: Principales diferencias entre GenoType® MTBC y SO-MTBC

*Si se realiza con el kit proporcionado por el fabricante

El uso de GenoType® MTBC, del mismo modo que el SO-MTBC diseñado en el presente trabajo, no está validado para muestras clínicas, sólo se realiza a partir de aislados ya que se requiere una cantidad de ADN para realizar la PCR multiplex (muchas dianas) que en escasas ocasiones están presentes en las muestras clínicas de

estos pacientes pudiendo llegar a causar falsos negativos del test. A pesar de estas recomendaciones se ha publicado algún estudio del test comercial GenoType® MTBC aplicándolo sobre muestras clínicas obteniendo buenos resultados en muestras con baciloscopia positiva¹⁷².

Con el esquema del SO-MTBC se llega a la identificación de todas las especies que componen el complejo *M.tuberculosis*, excepto *M. pinnipedii* que, según los resultados de las pruebas moleculares estudiadas, sería indistinguible de *M.africanum* tipo I⁵⁷. Actualmente solo se ha descrito un conjunto de casos de transmisión a humanos de *M. pinnipedii*⁴³ en un contexto de un brote de tuberculosis en leones marinos de un zoo en Holanda.

Ante los resultados obtenidos en la validación del SO-MTBC, cabe destacar el alto nivel de concordancia ($\kappa=0,95$) entre éste y GenoType® MTBC para diferenciar entre los miembros del complejo *M.tuberculosis*. Solo se produjo una discrepancia entre ambos ensayos. La cepa en cuestión fue identificada como *M.africanum* utilizando el SO-MTBC y como *M.tuberculosis* utilizando GenoType® MTBC. Finalmente, tras su estudio en el Centro Nacional de Microbiología se confirmó la identidad como *M.tuberculosis*. En particular, éstas dos especies son especialmente similares; de hecho hasta hace poco tiempo la especie de *M.africanum* estaba separada en dos tipos, el I y II. Recientemente se ha considerado que el antiguo *M.africanum* tipo II debe incluirse en la especie *M.tuberculosis*^{24,68} Además algunos linajes del tipo I (subtipo *West African 1*, subtipo *West African 2*) son muy difíciles de distinguir de la especie *M.tuberculosis*¹⁷⁷.

La mayoría de los estudios publicados actualmente en referencia a la diferenciación de las especies del complejo utilizan como herramienta para la identificación el kit comercial GenoType® MTBC. Los resultados que se han obtenido al analizar las cepas de los pacientes con tuberculosis del área Norte de Granada se asemejan a los encontrados por otros autores en países como Turquía²⁷ y Alemania¹⁷⁸ con un 94% y un 92% de *M.tuberculosis* respectivamente y un 6% y 8% de especies no tuberculosis del complejo (Tabla 28). Predominan los estudios que obtienen un porcentaje aún mayor de la especie *M.tuberculosis*, en torno a un 99-100%^{176,179-181}. Sin embargo cabe destacar en primer lugar el estudio realizado por Somoskowy y col.¹⁷² en Nueva York en el que la especie mayoritaria identificada no fue *M.tuberculosis* sino *M.africanum*; y en segundo lugar la publicación realizada en Alemania por Richter y col. en 2003¹⁷¹ donde

M.tuberculosis supuso solo un 35,4% del total de especies identificadas. En España Romero Torres y col. publicaron en el año 2007 una comparación entre dos sistemas de especiación y estudiaron 103 cepas clínicas de pacientes tuberculosos obteniendo un 74,7% de cepas identificadas como *M.tuberculosis* y el resto fueron cepas de las demás especies del complejo; encontrando al menos una cepa de cada especie de entre las cepas analizadas. Todos los estudios citados anteriormente no tenían como objetivo principal conocer las especies del complejo que estaban presentes en el medio sino que la mayoría de ellos realizaban estudios comparativos de las diferentes técnicas disponibles para la identificación a nivel de especie. Cabe destacar las grandes diferencias encontradas entre los autores en referencia al porcentaje de cada especie del complejo encontrada. La explicación radica principalmente en las diferentes localizaciones geográficas donde se realizan dichos estudios; de hecho es bien conocido que la distribución de las distintas especies a través del mundo no es uniforme. Por ejemplo, en países desarrollados la tuberculosis bovina es menos frecuente ya que se han implementado medidas epidemiológicas para el control del reservorio animal. En algunos países, el uso de la vacuna BCG ha causado que aparezcan casos de infección por *M.bovis* BCG asociado al uso de esta vacuna¹⁸² *M.africanum* es endémico del Este de África donde causa más de la mitad de los casos de TB pulmonar²⁴. Estos hechos junto con la heterogeneidad de las poblaciones de estudio explican los resultados de los estudios comentados anteriormente difieran entre sí.

Otras opciones posiblemente disponibles en un futuro es la especiación mediante espectrometría de masas MALDI TOF. Numerosos autores han realizado intentos de desmembrar el complejo *M.tuberculosis* y otros complejos micobacterianos con esta técnica aunque por ahora no se han obtenido buenos resultados^{132,133,179,183}. Entre otros, los motivos podrían ser la ausencia de muchas especies en la base de datos de espectros proporcionadas por casas comerciales y la dificultad del protocolo de extracción debido a características intrínsecas de la pared de las micobacterias. Las publicaciones actualmente concluyen que si se construye una base de espectro con varias cepas de todas las especies del complejo ayudaría a mejorar el rendimiento de ésta técnica para diferenciar las especies más cercanas.

Discusión

| Autor, año, país del estudio | <i>M. tuberculosis</i> | <i>M. bovis</i> | <i>M. bovis</i> BCG | <i>M. africanum</i> | <i>M. microti</i> | <i>M. caprae</i> | <i>M. canettii</i> | Técnicas utilizadas |
|--|------------------------|-----------------|---------------------|---------------------|-------------------|------------------|--------------------|--|
| Ueayama, 2014, Japón ¹⁷⁹ | 968/970 | 0 | 0 | 2/970 | 0 | 0 | 0 | PCR RD |
| Bayraktar, 2011, Turquía ²⁷ | 177/188 | 7/188 | 1/188 | 0 | 0 | 3/188 | 0 | Genotype MTBC /RFLP <i>hsp65</i> y <i>gyrB</i> |
| Safianowska, 2009, Polonia ¹⁷⁶ | 166/166 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | GenoType MTBC * MTCB/HPLC |
| Kjeldsen, 2009, Dinamarca ¹⁸⁰ | 383/387 | 1/387 | 3/387 | 0 | 0 | 0 | 0 | GenoType MTCB/RFLP |
| Somoskowy, 2008, Nueva York ¹⁷² | 38/157 | 37/157 | 34/157 | 47/157 | 0 | 1/157 | 0 | Genotype MTBC /PCR RD |
| Neonakis, 2007, Grecia ¹⁸¹ | 119/120 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1/120 | 0 | GenoType MTBC /Pruebas bioquímicas |
| Romero Gómez, 2007, España ¹⁷⁵ | 77/103 | 6/103 | 12/103 | 3/103 | 1/103 | 3/103 | 1/103 | GenoType MTBC /RFPL PCR <i>gyrB</i> /PCR RD1 y RD9/Pruebas bioquímicas |
| Richter, 2004, Alemania ¹⁷⁸ | 71/77 | 5/77 | 0 | 1/77 | 0 | 0 | 0 | Genotype MTBC /puebas bioquímicas/SNPs <i>gyrB</i> /spoligotyping |
| Richter, 2003, Alemania ^{171**} | 29/82 | 17/82 | 4/82 | 6/82 | 9/82 | 17/82 | 0 | GenoType MTBC /RFPL PCR <i>gyrB</i> /PCR RD1/Pruebas bioquímicas |
| Este estudio | 175/189 | 7/189 | 5/189 | 1/189 | 0 | 1/189 | 0 | PCR RD/GenoType MTBC |

Tabla 28: Estudios publicados sobre especiación del complejo *M.tuberculosis*

*GenoType MTBC no diferencia *M.tuberculosis*/*M.canettii*

** Aislados clínicos y veterinarios

5.3 Descripción las características clínico-epidemiológicas de los casos de tuberculosis diagnosticados en el Área Norte de Granada desde 2011 hasta 2014.

La obtención de tasas de incidencia de determinadas enfermedades como la tuberculosis, así como las características de los pacientes, son objetivos importantes desde los puntos de vista epidemiológico y administrativo, para planificar y evaluar los programas de control, así como para la adjudicación de los recursos asistenciales. La incidencia de tuberculosis en España sigue disminuyendo, pero el porcentaje de descenso (8% en 2013) no es suficiente para alcanzar los objetivos propuestos por la OMS, de llegar a la eliminación en 2050¹¹. La disminución de las tasas en España se debe fundamentalmente al descenso de las formas respiratorias, mientras que las de otras localizaciones disminuyen más lentamente. Este hecho que se puede atribuir a distintos factores como la mayor dificultad en el diagnóstico y tratamiento o el aumento de población inmigrante procedente de países con mayores prevalencias de tuberculosis de localización no pulmonar. La incidencia de tuberculosis en el Área Norte de Granada (23,76 casos por 100.000 habitantes en 2013) es más elevada que la de España (11,88 casos por 100.000 habitantes)¹⁸⁴. Esto puede significar mal control de la enfermedad o bien, mejor registro o mayor detección de casos por búsqueda de éstos incluso entre pacientes con pocos síntomas. En la provincia de Granada, la tendencia de la tasa de incidencia de tuberculosis es también descendente, si bien cabe destacar un pico de incidencia entre los años 2008-2009 (Ver Gráfico 15). En 2013, el número de casos registrados aumentó ligeramente respecto al año previo, tanto en autóctonos como en inmigrantes, este hecho también queda reflejado en los datos obtenidos en nuestro ámbito de estudio siendo el número de casos de tuberculosis en 2013 ligeramente superior a los años previos y posteriores (Ver Gráfico 16). Cabe destacar que, en el Área Norte de Granada, el aumento de casos producidos en ese año no fue solo a consta de formas clínicas respiratorias sino que en 2013 y paralelamente a lo ocurrido con la tuberculosis respiratoria, también se registró el mayor número de casos de tuberculosis extrarrespiratoria del periodo de estudio analizado.

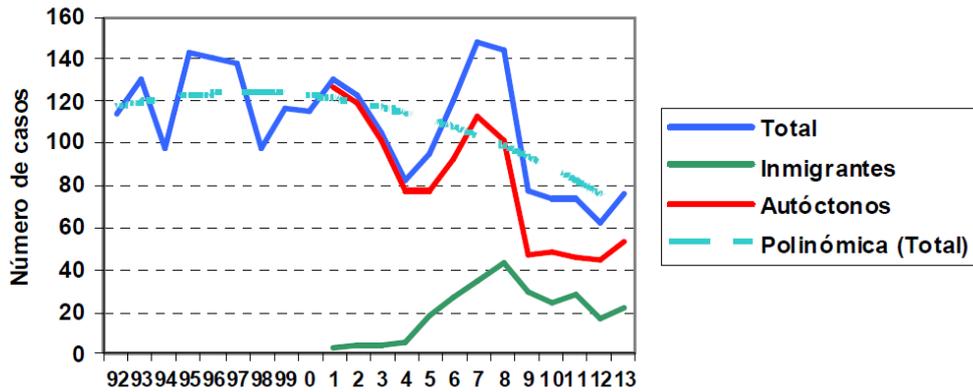


Gráfico 15: Número de casos de Tuberculosis Respiratoria registrados en Granada, según población inmigrante o población autóctona.

Tomado de Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Andalucía, 2015¹⁸⁵

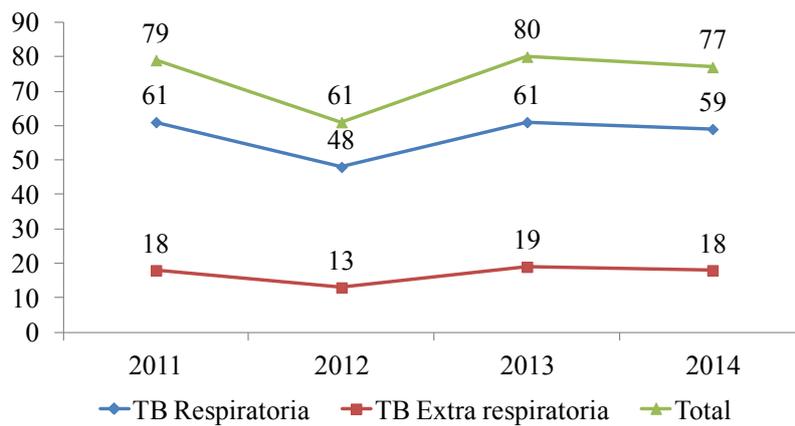


Gráfico 16: Evolución del número de casos de TB respiratoria y TB extrarrespiratoria durante el periodo de estudio (2011-2014) en Granada

Respecto al sexo, la tuberculosis en España sigue afectando mayoritariamente a los hombres que suponen el 60% de los casos; dato que coincide con el encontrado en nuestro ámbito de estudio (61,95%) del mismo modo que la edad media de los pacientes, que en nuestro caso fue de 41 años y a nivel global se establece la media de edad de 46 + 21 años en hombres y 43 + 22 en mujeres¹⁰⁴. El aumento de incidencia que se observa en hombres a partir de las edades adultas podría estar relacionado al mayor predominio de factores y comportamientos de riesgo (VIH, tabaquismo, exposición

laboral) respecto a las mujeres, así como a reactivaciones de la enfermedad producidas en la edad adulta.

Según los datos del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Andalucía (SVEA), la proporción de casos nacidos fuera de España se mantiene estable los últimos años, cercana al 30%, dato muy similar aunque ligeramente más bajo (26%) al encontrado en nuestro ámbito de estudio. Los países de los que proceden estos pacientes son siempre proporcionales a la nacionalidad de los inmigrantes residentes en Granada. La mayoría de los casos de tuberculosis en inmigrantes se producen en adultos jóvenes, grupo donde se produce una transmisión más activa, este hecho unido a las precarias condiciones de vida, hacinamiento y movilidad laboral hace especialmente relevante el diagnóstico precoz y estudio de contactos para cortar lo antes posible las cadenas de transmisión¹⁸⁶

La epidemia del SIDA ha sido, probablemente, el principal factor de riesgo asociado a la evolución de la tuberculosis hasta hace poco tiempo y su descenso ha ido paralelo con el de la tuberculosis a partir del año 1994. El amplio acceso al tratamiento antirretroviral de alta actividad (TARGA), incluso para grupos marginales como reclusos y adictos a drogas, ha determinado claramente este declive, de manera que la tendencia de la tuberculosis actual parece ser independiente de la infección por el VIH. Actualmente durante el periodo de estudio (2011-2014) la proporción de pacientes con coinfección VIH/TB fue del 5,05% del total, dato similar al de la media de países de la Unión Europea¹⁰³

La hospitalización de los pacientes a causa de la tuberculosis llevó en nuestro caso a una estancia media de 15 días. Esta cifra es similar a otros estudios realizados en España¹⁸⁷ donde obtienen una media de 14 días de estancia hospitalaria, o 18 días en un estudio en la Comunidad valenciana¹⁸⁸. La estancia media refleja en gran medida la existencia de complicaciones asociadas a la tuberculosis, tanto por la edad, como por la localización de la enfermedad (las formas de tuberculosis que requirieron una estancia hospitalaria de mayor duración fueron las extratorácicas sobre todo las del sistema nervioso central, la diseminada y la osteoarticular).

Discusión

Aunque los indicadores epidemiológicos son favorables, hay que estar atentos a la evolución de aquellos relativos a la tuberculosis infantil, y a otros grupos especialmente vulnerables como inmigrantes y VIH positivos ¹⁰⁴

► CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El uso de Speed Oligo® Direct *Mycobacterium tuberculosis* (SO-DMT) como herramienta diagnóstica a partir de muestras clínicas respiratorias ha mostrado una excelente sensibilidad y especificidad para muestras con baciloscopia positiva, siendo menor esta sensibilidad en aquellas muestras con baciloscopia negativa en el diagnóstico de la tuberculosis.

2. Speed Oligo® Direct *Mycobacterium tuberculosis* (SO-DMT) permite de manera rápida, fácil y sin equipamientos sofisticados detectar la presencia de micobacterias en muestras clínicas directas, permitiendo la diferenciación entre *Mycobacterium tuberculosis* y micobacterias no tuberculosas (MNT) en caso de baciloscopia positiva.

3. El empleo de Speed Oligo® Direct *Mycobacterium tuberculosis* (SO-DMT) posibilita la obtención de resultados en un periodo corto de tiempo, lo cual ayuda a la instauración precoz del tratamiento antibiótico necesario para los casos de tuberculosis.

4. Las dianas genéticas utilizadas para el desarrollo del Speed Oligo® *Mycobacterium tuberculosis* complex (SO-MTBC) RD1, RD4, RD9 y RD12 han permitido diferenciar cada uno de los componentes del complejo de una manera eficaz.

5. Los productos de amplificación generados para cada diana ensayada presentaban las características adecuadas para su utilización en el formato Speed Oligo® en cuanto a su tamaño, contenido en G+C y su temperatura de *melting*.

Conclusiones

6. Se obtuvo una combinación idónea de solución de hibridación y de conjugados de oro coloidal, que permitían una adecuada intensidad y homogeneidad de señal en las tiras de nitrocelulosa usadas en el Speed Oligo® *Mycobacterium tuberculosis* complex (SO-MTBC) para obtener los resultados.

7. La evaluación de Speed Oligo® *Mycobacterium tuberculosis* complex (SO-MTBC) con cepas de *Mycobacterium tuberculosis* complex aisladas en nuestro laboratorio, mostró una excelente concordancia al compararlo con el Kit GenoType® MTBC (Hain Lifescience), presentando un mínimo número de discrepancias

8. La subespecie del complejo de *M.tuberculosis* más ampliamente identificada con SO-MTBC fue *M.tuberculosis*, seguida de *M.bovis*, *M.bovis* BCG, *M.africanum* y *M.caprae*. No se detectaron aislados del resto de subespecies del complejo.

9. La especificidad del SO-MTBC fue excelente, ya que para ninguna de las MNT, ni otras bacterias relacionadas con el género ensayadas, se obtuvo ninguna señal de amplificación.

10. La incidencia de tuberculosis en nuestra población estudio fue superior a la declarada en España, no mostrando variaciones significativas a lo largo de los años

► BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Brock TD. Robert Koch: A Life in Medicine and Bacteriology. 1988.
2. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998;393(6685):537–44.
3. Lew JM, Kapopoulou A, Jones LM, Cole ST. TubercuList--10 years after. *Tuberculosis (Edinb)* 2011 ;91(1):1–7.
4. Pfyffer GE, Palicova F. *Mycobacterium*: General characteristics, Laboratory Detection, and staining procedures. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. *Manual of Clinical microbiology*. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 472–502.
5. Gorocica P, Jiménez-Martínez M del C, Garfias Y, Sada I, Lascurain R. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev del Inst* 2005
6. Alcaide Fernández de Vega F, Esteban Moreno J, González Martín J, Palacios Gutiérrez JJ. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Micobacterias* 2005
7. Lehmann K, Neumann R. *Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speciellen bakteriologischen Diagnostik*. 1st ed. Múnich: 1896.
8. Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, et al. *The Actinobacteria*. New York: Springer; 2012.
9. Runyon E. Source of scotochromogens. *Am Rev Respir Dis* 1959
10. Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, et al., editors. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. Volume Five: The Actinobacteria, Part A and B* 2nd Edition. USA: 2012.

Bibliografía

11. World Health Organization. Global tuberculosis report 2014. Ginebra: 2014.
12. Ghodbane R, Drancourt M. Non-human sources of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 2013 93(6):589–95.
13. Paudel S, Mikota SK, Nakajima C, et al. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from elephants of Nepal. *Tuberculosis (Edinb)* 2014;94(3):287–92.
14. Neill SD, Pollock JM, Bryson DB, Hanna J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol* 1994;40(1-2):41–52.
15. O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis* 1995;76 Suppl 1:1–46.
16. Farga V, Caminero JA. Historia natural de la tuberculosis en el ser humano. Etiopatogenia. In: *Tuberculosis 3ra Edición*. Santiago de Chile: 2011. p. 27–55.
17. Calmette A. *La Vaccination Preventive Contre la Tuberculose*. Masson; 1927.
18. Lamm DL. Efficacy and safety of bacille Calmette-Guérin immunotherapy in superficial bladder cancer. *Clin Infect Dis* 2000;31 Suppl 3:S86–90.
19. Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, et al. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* 1991;351(6326):456–60.
20. Isabel Cameo M, Antonia Lezcano M, Gil D, Blas M. Tuberculosis urinaria por *Mycobacterium bovis* variedad del BCG, secundaria a instilación endovesical. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2010;28(2):134–5.
21. Macía Villa C, Sifuentes Giraldo W, Boteanu A, González Lanza M, Bachiller Corral J. Artritis reactiva secundaria a la instilación intravesical de bacilo de Calmette-Guérin. *Reumatol Clin* 2012;8(5):284–6.
22. Garmilla-Ezquerro P, Martínez-De Las Cuevas G, Hernández-Hernández JL. Hepatitis granulomatosa y sepsis secundaria a instilación intravesical de bacilo de Calmette-Guérin. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012;30(10):656–7.

23. Isea-Peña MC, Brezmes-Valdivieso MF, González-Velasco MC, et al. *Mycobacterium africanum*, an emerging disease in high-income countries? *Int J Tuberc Lung Dis* 2012;16:1400–4.
24. De Jong BC, Antonio M, Gagneux S. *Mycobacterium africanum*--review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4(9):e744.
25. Niemann S, Kubica T, Bange FC, et al. The species *Mycobacterium africanum* in the light of new molecular markers. *J Clin Microbiol* 2004;42(9):3958–62.
26. Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Domínguez L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53(Pt 6):1785–9.
27. Bayraktar B, Bulut E, Bariş AB, et al. Species distribution of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical isolates from 2007 to 2010 in Turkey: a prospective study. *J Clin Microbiol* 2011;49(11):3837–41.
28. Prodingler WM, Brandstätter A, Naumann L, et al. Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *J Clin Microbiol* 2005;43(10):4984–92.
29. Hansen N, Seiler C, Rumpf J, et al. Human tuberculous meningitis caused by *mycobacterium caprae*. *Case Rep Neurol* 2012;4(1):54–60.
30. Cvetnic Z, Katalinic-Jankovic V, Sostaric B, et al. *Mycobacterium caprae* in cattle and humans in Croatia. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007;11(6):652–8.
31. Sintchenko V, Jelfs P, Dally M, Crighton T, Gilbert GL. A case of urinary tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* subspecies *caprae*. 2006.
32. Meyer S, Naumann L, Landthaler M, Vogt T. Lupus vulgaris caused by *Mycobacterium bovis* ssp. *caprae*. *Br. J. Dermatol.* 2005;153(1):220–2.

33. Blaas SH, Böhm S, Martin G, et al. Pericarditis as primary manifestation of *Mycobacterium bovis* ssp. *caprae* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;47(2):431–3.
34. Blouin Y, Cazajous G, Dehan C, et al. Progenitor “*Mycobacterium canettii*” clone responsible for lymph node tuberculosis epidemic, Djibouti. *Emerg Infect Dis* 2014;20(1):21–8.
35. Fabre M, Hauck Y, Soler C, et al. Molecular characteristics of “*Mycobacterium canettii*” the smooth *Mycobacterium tuberculosis* bacilli. *Infect Genet Evo* 2010;10(8):1165–73.
36. Frank W, Reisinger EC, Brandt-Hamerla W, Schwede I, Handrick W. *Mycobacterium microti*--pulmonary tuberculosis in an immunocompetent patient. *Wien Klin Wochenschr* 2009;121(7-8):282–6.
37. Niemann S, Richter E, Dalügge-Tamm H, et al. Two cases of *Mycobacterium microti* derived tuberculosis in HIV-negative immunocompetent patients. *Emerg Infect Dis* 2000 ;6(5):539–42.
38. Kipar A, Burthe SJ, Hetzel U, et al. *Mycobacterium microti* Tuberculosis in Its Maintenance Host, the Field Vole (*Microtus agrestis*): Characterization of the Disease and Possible Routes of Transmission. *Vet Pathol* 2014 Sep;51(5):903-14
39. Palgrave CJ, Benato L, Eatwell K, Laurenson IF, Smith NH. *Mycobacterium microti* Infection in Two Meerkats (*Suricata suricatta*). *J Comp Pathol* 2012;146(2-3):278–82.
40. Boniotti MB, Gaffuri A, Gelmetti D, et al. Detection and molecular characterization of *Mycobacterium microti* isolates in wild boar from northern Italy. *J Clin Microbiol* 2014;52(8):2834–43.
41. Xavier Emmanuel F, Seagar A-L, Doig C, Rayner A, Claxton P, Laurenson I. Human and animal infections with *Mycobacterium microti*, Scotland. *Emerg Infect Dis* 2007;13(12):1924–7.

42. Cousins D V, Bastida R, Cataldi A, et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53(Pt 5):1305–14.
43. Kiers a, Klarenbeek a, Mendelits B, Van Soolingen D, Koëter G. Transmission of *Mycobacterium pinnipedii* to humans in a zoo with marine mammals. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008;12(12):1469–73.
44. Loeffler SH, de Lisle GW, Neill MA, et al. The seal tuberculosis agent, *Mycobacterium pinnipedii*, infects domestic cattle in New Zealand: epidemiologic factors and DNA strain typing. *J Wildl Dis* 2014;50(2):180–7.
45. Hatfull GF, Jacobs Jr. WR. *Molecular genetics of mycobacteria*. ASM Press, 2000.
46. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 2001;409(6823):1007–11.
47. Garnier T, Eiglmeier K, Camus J-C, et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(13):7877–82.
48. Brosch R, Gordon S V, Garnier T, et al. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(13):5596–601.
49. Camus J-C, Pryor MJ, Médigue C, Cole ST. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* 2002;148(Pt 10):2967–73.
50. Marri PR, Bannantine JP, Golding GB. Comparative genomics of metabolic pathways in *Mycobacterium* species: gene duplication, gene decay and lateral gene transfer. *FEMS Microbiol Rev* 2006;30(6):906–25.
51. Braibant M, Gilot P, Content J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Rev* 2000;24(4):449–67.

52. Cole ST. Learning from the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *FEBS Lett* 1999;452(1-2):7–10.
53. Bottai D, Brosch R. Mycobacterial PE, PPE and ESX clusters: novel insights into the secretion of these most unusual protein families. *Mol Microbiol* 2009;73(3):325–8.
54. Brosch R, Gordon S V, Marmiesse M, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(6):3684–9.
55. Ernst JD, Trevejo-Nuñez G, Banaiee N. Genomics and the evolution, pathogenesis, and diagnosis of tuberculosis. *J Clin Invest* 2007;117(7):1738–45.
56. Brosch R, Gordon S V, Pym A, Eiglmeier K, Garnier T, Cole ST. Comparative genomics of the mycobacteria. *Int J Med Microbiol* 2000;290(2):143–52.
57. Warren RM, Gey van Pittius NC, Barnard M, et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006;10(7):818–22. A
58. Huard RC, Lazzarini LC de O, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol* 2003;41(4):1637–50.
59. Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol* 2002;46(3):709–17.
60. Herrera-León L, Pozuelo-Díaz R, Molina Moreno T, Valverde Cobacho A, Saiz Vega P, Jiménez Pajares MS. [Differentiation of species within the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular techniques]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009;27(9):496–502.

61. Chandra Rai R, Dwivedi VP, Chatterjee S, Raghava Prasad DV, Das G. Early secretory antigenic target-6 of *Mycobacterium tuberculosis*: enigmatic factor in pathogen-host interactions. *Microbes Infect* 2012;14(13):1220–6. A
62. Parsons LM, Brosch R, Cole ST, et al. Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. *J Clin Microbiol* 2002;40(7):2339–45.
63. Pinsky B a, Banaei N. Multiplex real-time PCR assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex members to the species level. *J Clin Microbiol* 2008;46(7):2241–6. A
64. Pounder JI, Anderson CM, Voelkerding K V, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex differentiation by genomic deletion patterns with multiplex polymerase chain reaction and melting analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;67(1):101–5.
65. Halse T a, Escuyer VE, Musser K a. Evaluation of a single-tube multiplex real-time PCR for differentiation of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2011;49(7):2562–7.
66. Gordon S V, Brosch R, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Cole ST. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol* 1999;32(3):643–55.
67. Mostowy S, Cousins D, Brinkman J, Aranaz A, Behr MA. Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Infect Dis* 2002;186(1):74–80.
68. Mostowy S, Onipede A, Gagneux S, et al. Genomic analysis distinguishes *Mycobacterium africanum*. *J Clin Microbiol* 2004;42(8):3594–9.
69. Fitzgerald DW, Sterling TR, Haas DW. *Mycobacterium tuberculosis*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's, principles and practice of infectious diseases*. 2010. p. 3129–64.

70. Lowrie DB, Andrew PW. Macrophage antimycobacterial mechanisms. *Br Med Bull* 1988;44(3):624–34.
71. Rook GA. Role of activated macrophages in the immunopathology of tuberculosis. *Br Med Bull* 1988;44(3):611–23.
72. Wlodarska M, Johnston JC, Gardy JL, Tang P. A Microbiological Revolution Meets an Ancient Disease: Improving the Management of Tuberculosis with Genomics. *Clin Microbiol Rev* 2015;28(2):523–39.
73. Ruiz Manzano J, Cardona Iglesias P, Caylà Buqueras J, Ausina Ruiz V. Tuberculosis. In: *Medicina Interna “Farreras-Rozman.”* 2004. p. 2321–31.
74. Caminero Luna JA. Patogenia de la tuberculosis. Infección y enfermedad. In: *Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER), editor. Guía de la tuberculosis para médicos especialistas.* 2003. p. 52–9.
75. González-Martín J, García-García JM, Anibarro L, et al. Consensus document on the diagnosis, treatment and prevention of tuberculosis. *Arch Bronconeumol* 2010;46(5):255–74.
76. Russell DG, Cardona P, Kim M, Allain S, Altare F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol* 2009;10(9):943–8.
77. Cagatay AA, Caliskan Y, Aksoz S, et al. Extrapulmonary tuberculosis in immunocompetent adults. *Scand J Infect Dis* 2004;36(11-12):799–806.
78. Thwaites GE, van Toorn R, Schoeman J. Tuberculous meningitis: more questions, still too few answers. *Lancet Neurol* 2013;12:999–1010.
79. Trecarichi EM, Di Meco E, Mazzotta V, Fantoni M. Tuberculous spondylodiscitis: Epidemiology, clinical features, treatment, and outcome. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2012;16:58–72.

80. Daher EDF, da Silva GB, Barros EJG. Renal tuberculosis in the modern era. *Am J Trop Med Hyg* 2013;88:54–64.
81. Sharma SK, Mohan A, Sharma A, Mitra DK. Miliary tuberculosis: new insights into an old disease. *Lancet Infect Dis* 2005;5:415–30.
82. Benwill JL, Sarria JC. Laryngeal tuberculosis in the United States of America: A forgotten disease. *Scand J Infect Dis* 2014;46(4):241–9.
83. Chaudhary P. Hepatobiliary tuberculosis. *Ann Gastroenterol* 2014;27:207–11.
84. Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre el Diagnóstico, el Tratamiento y la Prevención de la Tuberculosis. Centro Cochrane Iberoamericano coordinador. *Guía de Práctica Clínica sobre el Diagnóstico, el Tratamiento y la Prevención de la Tuberculosis*. 2010th ed. 2010
85. Ferguson JS, Schlesinger LS. Pulmonary surfactant in innate immunity and the pathogenesis of tuberculosis. *Tuber Lung Dis* 2000;80(4-5):173–84.
86. Arnold RR, Russell JE, Champion WJ, Brewer M, Gauthier JJ. Bactericidal activity of human lactoferrin: differentiation from the stasis of iron deprivation. *Infect Immun* 1982;35(3):792–9.
87. Schlesinger LS. Mycobacterium tuberculosis and the complement system. *Trends Microbiol* 1998;6(2):47–9; discussion 49–50.
88. Tailleux L, Schwartz O, Herrmann J-L, et al. DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. *J Exp Med* 2003;197(1):121–7.
89. Schorey JS, Carroll MC, Brown EJ. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science* 1997;277(5329):1091–3.
90. López M, Sly LM, Luu Y, Young D, Cooper H, Reiner NE. The 19-kDa Mycobacterium tuberculosis protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2. *J Immunol* 2003;170(5):2409–16.

91. Vasselon T, Detmers PA. Toll receptors: a central element in innate immune responses. *Infect Immun* 2002;70(3):1033–41.
92. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004;5(10):987–95.
93. Skinner HA. *The Origin of Medical Terms*. 1961.
94. Koch R. *Classics in infectious diseases. The etiology of tuberculosis: Robert Koch*. Berlin, Germany 1882. *Rev Infect Dis* 1882;4(6):1270–4.
95. Caminero Luna JA. Breves reseñas históricas sobre la tuberculosis. In: Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER), editor. *Guía de la tuberculosis para médicos especialistas*. 2003. p. 17–24.
96. Ziehl F. Zur Färbung des Tuberkelbacillus. *Dtsch Med Wochenschr* 1882;8:451–3.
97. Neelsen F. Ein casuistischer Beitrag zu Lehre von der Tuberkulose. *Cent für die medizinischen Wissenschaften* 1883;28:497–501.
98. Von Pirquet C. Der diagnostische wert der kutanen tuberkulinreaktion bei der tuberkulose des kindesalters auf grund von 100 sektionen. *Wien Klin Wchenschr* 1907;20:1123–8.
99. Mantoux C. L'intradermo-réaction à la tuberculina et son interprétation clinique. *Press Med* 1910;18:10–3.
100. Calmette A, Plotz H. Protective inoculation against tuberculosis with BCG. *Am Rev Tuberc* 1929;19:567–72.
101. Iseman MD. Tuberculosis therapy: past, present and future. *Eur Respir J Suppl* 2002;36:87s – 94s.
102. Wassersug JD. Pulmonary tuberculosis. *N Engl J Med* 1946;235(7):220–9.

103. European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2014. Stockholm: 2014.
104. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto Carlos III. Informe epidemiológico sobre la situación de la tuberculosis en España. Año 2013. Madrid: 2014.
105. Suchindran S, Brouwer ES, Van Rie A. Is HIV infection a risk factor for multi-drug resistant tuberculosis? A systematic review. *PLoS One* 2009;4(5):e5561.
106. World Health Organization. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013. Ginebra: 2013.
107. Muñoz P, Rodríguez C, Bouza E. Mycobacterium tuberculosis infection in recipients of solid organ transplants. *Clin Infect Dis* 2005;40(4):581–7.
108. Aguado JM, Torre-Cisneros J, Fortún J, et al. Tuberculosis in solid-organ transplant recipients: consensus statement of the group for the study of infection in transplant recipients (GESITRA) of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology. *Clin Infect Dis* 2009;48(9):1276–84.
109. Ayats Ardite J, Fortún Abete J, de Oña Navarro M, Pérez Sáenz JL, Pumarola Suñé T. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. *Microbiología del trasplante*. 2010;
110. García-Pachón E, Rodríguez JC. Molecular epidemiology of tuberculosis: main findings and their application in Spain. *Arch Bronconeumol* 2005;41(11):618–24.
111. Barnes PF, Cave MD. Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med* 2003;349(12):1149–56.
112. Soini H, Pan X, Teeter L, Musser JM, Graviss EA. Transmission dynamics and molecular characterization of Mycobacterium tuberculosis isolates with low copy numbers of IS6110. *J Clin Microbiol* 2001;39(1):217–21.

113. Ruiz M, Rodríguez JC, Samper S, Royo G. Genomic typing of *M. tuberculosis* strains with few IS6110 copies: usefulness of amplified fragment length polymorphism (AFLP), variable number tandem repeat (VNTR) and spoligotyping. *Med Clin (Barc)* 2005;124(2):75–6.
114. Van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med* 2001;249(1):1–26.
115. Dale JW, Brittain D, Cataldi AA, et al. Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardised nomenclature. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001;5(3):216–9.
116. Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, et al. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(4):1901–6.
117. Steffen RE, Caetano R, Pinto M, et al. Cost-effectiveness of Quantiferon®-TB Gold-in-Tube versus tuberculin skin testing for contact screening and treatment of latent tuberculosis infection in Brazil. *PLoS One* 2013;8(4):e59546.
118. Cobelens FGJ, Menzies D, Farhat M. False-positive tuberculin reactions due to non-tuberculous mycobacterial infections. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007;11(8):934–5;author reply 935.
119. Menzies D. What does tuberculin reactivity after bacille Calmette-Guérin vaccination tell us? *Clin Infect Dis* 2000;31 Suppl 3:S71–4.
120. Horsburgh CR, Rubin EJ. Clinical practice. Latent tuberculosis infection in the United States. *N Engl J Med* 2011;364(15):1441–8.
121. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000;356(9235):1099–104.
122. Lalvani A, Pathan AA, Durkan H, et al. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet* 2001;357:2017–21.

Bibliografía

123. Ewer K, Deeks J, Alvarez L, et al. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. *Lancet* 2003;361:1168–73.
124. Pai M, Denkinger CM, Kik S V, et al. Gamma interferon release assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Microbiol Rev* 2014;27(1):3–20.
125. Apers L, Mutsvangwa J, Magwenzi J, et al. A comparison of direct microscopy, the concentration method and the *Mycobacteria* Growth Indicator Tube for the examination of sputum for acid-fast bacilli. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003;7(4):376–81.
126. Prats G. *Microbiología clínica*. Editorial Panamericana. 2006.
127. Tortoli E, Nanetti A, Piersimoni C, et al. Performance assessment of new multiplex probe assay for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2001;39(3):1079–84.
128. Dinnes J, Deeks J, Kunst H, et al. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technol Assess* 2007;11(3):1–196.
129. Muñoz Bellido JL, Vega Castaño S, Ferreira L, Sánchez Juanes F, González Buitrago JM. Proteomic applications in the Clinical Microbiology laboratory. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012;30(7):383–93.
130. Lotz A, Ferroni A, Beretti J-L, et al. Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010;48(12):4481–6.
131. El Khéchine A, Couderc C, Flaudrops C, Raoult D, Drancourt M. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of mycobacteria in routine clinical practice. *PLoS One* 2011;6(9):e24720.

132. Saleeb PG, Drake SK, Murray PR, Zelazny AM. Identification of mycobacteria in solid-culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2011;49(5):1790–4.
133. Lotz A, Ferroni A, Beretti J-L, et al. Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010;48(12):4481–6.
134. Chen JHK, Yam W-C, Ngan AHY, et al. Advantages of using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as a rapid diagnostic tool for identification of yeasts and mycobacteria in the clinical microbiological laboratory. *J Clin Microbiol* 2013;51:3981–7.
135. Farga V, Caminero JA. Tratamiento de la tuberculosis. Principios generales. In: *Tuberculosis 3ra Edición*. Santiago de Chile: 2011. p. 164–80.
136. World Health Organization. *Treatment of tuberculosis: guidelines*. 4th editio. Ginebra: WHO Press; 2010.
137. World Health Organization. *Companion Handbook to the WHO Guidelines for the Programmatic Management of Drug-Resistant Tuberculosis*. Ginebra: 2014.
138. Lee RE, Hurdle JG, Liu J, et al. Spectinamides: a new class of semisynthetic antituberculosis agents that overcome native drug efflux. *Nat Med* 2014; 20(2):152–8.
139. Zumla AI, Gillespie SH, Hoelscher M, et al. New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects. *Lancet Infect Dis* 2014;14(4):327–40.
140. Clemens JD, Chuong JJ, Feinstein AR. The BCG controversy. A methodological and statistical reappraisal. *JAMA* 1983;249(17):2362–9.
141. Lagranderie MR, Balazuc AM, Deriaud E, Leclerc CD, Gheorghiu M. Comparison of immune responses of mice immunized with five different *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains. *Infect Immun* 1996;64(1):1–9.

142. Halse T a, Escuyer VE, Musser K a. Evaluation of a single-tube multiplex real-time PCR for differentiation of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2011;49(7):2562–7.
143. Pinsky B a, Banaei N. Multiplex real-time PCR assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex members to the species level. *J Clin Microbiol* 2008;46(7):2241–6.
144. Costa P, Amaro A, Ferreira AS, et al. Rapid identification of veterinary-relevant *Mycobacterium tuberculosis* complex species using 16S rDNA, IS6110 and Regions of Difference-targeted dual-labelled hydrolysis probes. *J Microbiol Methods* 2014;107C:13–22.
145. 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;87:775–9.
146. Lara-Oya A, Mendoza-Lopez P, Rodriguez-Granger J, et al. Evaluation of the speed-oligo direct *Mycobacterium tuberculosis* assay for molecular detection of mycobacteria in clinical respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2013;51(1):77–82.
147. Kato-Maeda M, Rhee JT, Gingeras TR, et al. Comparing genomes within the species *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res.* 2001;11(4):547–54.
148. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* 1996;178(5):1274–82.
149. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 1999;284(5419):1520–3.
150. Parsons LM, Brosch R, Cole ST, et al. Rapid and Simple Approach for Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates by PCR-Based Genomic Deletion Analysis Rapid and Simple Approach for Identification of

- Mycobacterium tuberculosis Complex Isolates by PCR-Based Genomic Deletion An. 2002;
151. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993;31(2):175–8.
 152. Richter E, Brown-Elliott BA, Wallace RJ. Mycobacterium: Laboratory characteristics of slowly growing mycobacteria. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. *Manual of Clinical microbiology*. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 503–24.
 153. Peter-Getzlaff S, Lüthy J, Voit A, Bloemberg G V., Böttger EC. Detection and identification of Mycobacterium spp. in clinical specimens by combining the Roche Cobas Amplicor Mycobacterium tuberculosis assay with Mycobacterium genus detection and nucleic acid sequencing. *J Clin Microbiol* 2010;48(11):3943–8.
 154. Piersimoni C, Scarparo C, Piccoli P, et al. Performance assessment of two commercial amplification assays for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex from respiratory and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* 2002;40(11):4138–42.
 155. Ling DI, Flores LL, Riley LW, Pai M. Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: Meta-analyses and meta-regression. *PLoS One* 2008;3(2).
 156. Abanto SMH, Hirata MH, Hirata RDC, Mamizuka EM, Schmal M, Hoshino-Shimizu S. Evaluation of Hene-PCR assay for Mycobacterium detection in different clinical specimens from patients with or without tuberculosis-associated HIV infection. *J Clin Lab Anal* 2000;14(5):238–45.
 157. CDC. Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009;58(1):7–10.

158. Moure R, Torres M, Martín R, Alcaide F. Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex in Clinical Samples by a Molecular Method Based on GenoQuick Technology. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50(6):2089–91.
159. Tang N, Frank A, Pahalawatta V, et al. Analytical and clinical performance of Abbott RealTime MTB, an assay for detection of Mycobacterium tuberculosis in pulmonary specimens. *Tuberculosis (Edinb)* 2015;
160. 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(2):513–5.
161. Hofmann-Thiel S, Hoffmann H. Evaluation of Fluorotype MTB for detection of Mycobacterium tuberculosis complex DNA in clinical specimens from a low-incidence country. *BMC Infect Dis* 2014;14:59.
162. Honoré-Bouakline S, Vincensini JP, Giacuzzo V, Lagrange PH, Herrmann JL. Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: Impact of sample preparation and DNA extraction. *J Clin Microbiol* 2003;41(6):2323–9.
163. De Almeida IN, Da Silva Carvalho W, Rossetti ML, Costa ERD, De Miranda SS. Evaluation of six different DNA extraction methods for detection of Mycobacterium tuberculosis by means of PCR-IS6110: preliminary study. *BMC Res Notes* 2013;6:561.
164. Herrera-León L, Pozuelo-Díaz R, Molina Moreno T, Valverde Cobacho A, Saiz Vega P, Jiménez Pajares MS. [Differentiation of species within the Mycobacterium tuberculosis complex by molecular techniques]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009;27(9):496–502.
165. Kirschner P, Springer B, Vogel U, et al. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: Report of a 2-year experience in a clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1993;31(11):2882–9.

166. Imaeda T. Deoxyribonucleic Acid Relatedness Among Selected Strains of. *Int J Syst Bacteriol* 1985;147–50.
167. Reddington K, O’Grady J, Dorai-Raj S, Maher M, van Soolingen D, Barry T. Novel multiplex real-time PCR diagnostic assay for identification and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium canettii*, and *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microbiol* 2011;49(2):651–7. A
168. Reddington K, Zumla A, Bates M, et al. SeekTB, a two-stage multiplex real-time-PCR-based method for differentiation of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 2012;50(7):2203–6.
169. Bouakaze C, Keyser C, de Martino SJ, et al. Identification and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex species by use of a SNaPshot Minisequencing-based assay. *J Clin Microbiol* 2010;48(5):1758–66.
170. Devallois A, Khye Seng Goh, Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol* 1997;35(11):2969–73.
171. Richter E, Weizenegger M, Rüsç-Gerdes S, Niemann S. Evaluation of genotype MTBC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* 2003;41(6):2672–5. A
172. Somoskovi A, Dormandy J, Rivenburg J, Pedrosa M, McBride M, Salfinger M. Direct comparison of the genotype MTBC and genomic deletion assays in terms of ability to distinguish between members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical isolates and in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2008;46(5):1854–7.
173. Richter E, Weizenegger M, Rüsç-Gerdes S, Niemann S. Evaluation of genotype MTBC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* 2003;41:2672–5.

174. Richter E, Weizenegger M, Fahr AM, Rüscher-Gerdes S. Usefulness of the GenoType MTBC assay for differentiating species of the Mycobacterium tuberculosis complex in cultures obtained from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2004;42:4303–6.
175. Gómez MPR, Herrera-León L, Jiménez MS, Rodríguez JG. Comparison of GenoType® MTBC with RFLP-PCR and multiplex PCR to identify Mycobacterium tuberculosis complex species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007;26:63–6.
176. Safianowska A, Walkiewicz R, Nejman-Gryz P, Chazan R, Grubek-Jaworska H. Diagnostic utility of the molecular assay GenoType MTBC (HAIN Lifescience, Germany) for identification of tuberculous mycobacteria. *Pneumonol Alergol Pol* 2009;77(6):517–20.
177. Köser CU, Piñero-Fernández S, Niemann S, Summers DK. [The validity of Mycobacterium tuberculosis complex species identification. Comments on the article: “Differentiation of species within the Mycobacterium tuberculosis complex by molecular techniques”]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011;29(4):320.
178. Richter E, Weizenegger M, Fahr A-M, Rüscher-Gerdes S. Usefulness of the GenoType MTBC assay for differentiating species of the Mycobacterium tuberculosis complex in cultures obtained from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2004;42(9):4303–6.
179. Ueyama M, Chikamatsu K, Aono A, et al. Sub-speciation of Mycobacterium tuberculosis complex from tuberculosis patients in Japan. *Tuberculosis (Edinb)* 2014;94(1):15–9.
180. Kjeldsen MK, Bek D, Rasmussen EM, Priemé A, Thomsen VØ. Line probe assay for differentiation within Mycobacterium tuberculosis complex. Evaluation on clinical specimens and isolates including Mycobacterium pinnipedii. *Scand J Infect Dis* 2009;41(9):635–41.

181. Neonakis IK, Gitti Z, Petinaki E, Maraki S, Spandidos DA. Evaluation of the GenoType MTBC assay for differentiating 120 clinical Mycobacterium tuberculosis complex isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007;26(2):151–2.
182. Okazaki T, Ebihara S, Takahashi H, et al. Multiplex PCR-identified cutaneous tuberculosis evoked by Mycobacterium bovis BCG vaccination in a healthy baby. *J Clin Microbiol* 2005;43(1):523–5.
183. 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(6):1963–70.
184. Informe epidemiológico sobre la situación de la Tb España 2012.
185. Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Andalucía. Informe semanal. Viernes 13 de Marzo de 2015. Granada: 2015.
186. García-García JM, Blanquer R, Rodrigo T, et al. Social, clinical and microbiological differential characteristics of tuberculosis among immigrants in Spain. *PLoS One* 2011;6(1).
187. Culqui DR, Rodríguez-Valín, Elena, Martínez de Aragón MV. Epidemiology of hospitalizations for tuberculosis in Spain: Analysis of minimum data set 1999-2009. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2015;33(1):9–15.
188. Calpe J, Chiner E, Marín J, Armero V, Calpe A. Tuberculosis epidemiology in area 15 of the Spanish autonomous community of Valencia: evolution from 1987 through 2001. *Arch Bronconeumol* 2005;41(3):118–24.

▶ ANEXO. PUBLICACIÓN CIENTÍFICA

8. ANEXO. PUBLICACIÓN CIENTÍFICA



Evaluation of the Speed-oligo Direct *Mycobacterium tuberculosis* Assay for Molecular Detection of Mycobacteria in Clinical Respiratory Specimens

Ana Lara-Oya,^a Pablo Mendoza-Lopez,^b Javier Rodríguez-Granger,^a Ana María Fernández-Sánchez,^c María Pilar Bermúdez-Ruiz,^c Inmaculada Toro-Peinado,^c Begoña Palop-Borrás,^c Jose María Navarro-Marí,^a Miguel José Martínez-Lirola^d

Department of Microbiology, University Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain^a; Vircell S.L. Research, Santa Fé, Granada, Spain^b; Department of Microbiology, University Hospital Carlos Haya, Málaga, Spain^c; Clinical Management Unit of Biotechnology, Torrecardenas Hospital Complex, Almería, Spain^d

We present the first evaluation of a novel molecular assay, the Speed-oligo Direct *Mycobacterium tuberculosis* (SO-DMT) assay, which is based on PCR combined with a dipstick for the detection of mycobacteria and the specific identification of *M. tuberculosis* complex (MTC) in respiratory specimens. A blind evaluation was carried out in two stages: first, under experimental conditions on convenience samples comprising 20 negative specimens, 44 smear- and culture-positive respiratory specimens, and 11 sputa inoculated with various mycobacterium-related organisms; and second, in the routine workflow of 566 fresh respiratory specimens (4.9% acid-fast bacillus [AFB] smear positives, 7.6% MTC positives, and 1.8% nontuberculous mycobacteria [NTM] culture positives) from two *Mycobacterium* laboratories. SO-DMT assay showed no reactivity in any of the mycobacterium-free specimens or in those with mycobacterium-related organisms. Compared to culture, the sensitivity in the selected smear-positive specimens was 0.91 (0.92 for MTC and 0.90 for NTM), and there was no molecular detection of NTM in a tuberculosis case or vice versa. With respect to culture and clinical data, the sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values for the SO-DMT system in routine specimens were 0.76 (0.93 in smear positives [1.0 for MTC and 0.5 for NTM] and 0.56 in smear negatives [0.68 for MTC and 0.16 for NTM]), 0.99, 0.85 (1.00 in smear positives and 0.68 in smear negatives), and 0.97, respectively. Molecular misidentification of NTM cases occurred when testing 2 gastric aspirates from two children with clinically but not microbiologically confirmed lung tuberculosis. The SO-DMT assay appears to be a fast and easy alternative for detecting mycobacteria and differentiating MTC from NTM in smear-positive respiratory specimens.

Tuberculosis (TB) continues to be an important medical problem. Nontuberculous mycobacteria (NTM) causing clinical disease have become increasingly frequent and more varied, therefore the implementation of strategies for the rapid differentiation between NTM and *M. tuberculosis* complex (MTC) for early infection control and choice of antimicrobial therapy is now of primary importance (1–3).

Over the past 2 decades, the introduction of molecular sequence-based techniques for mycobacterial identification has enabled the recognition and reliable phylogenetic placement of more than 100 species (RIDOM [<http://www.ridom-rdna.de/>] and National Centre for Biotechnology Information databases [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]). This has led to the widespread application by microbiology laboratories in industrialized countries of commercially available molecular assays for species identification and drug susceptibility testing of mycobacteria growing on culture media (4–9). They have also been used in clinical specimens with the suspected presence of *Mycobacterium* spp. (10–12). The utilization of these assays markedly reduces the time to diagnosis required by conventional phenotypic methods (13).

In this study, we evaluated the performance of a novel oligo-chromatographic assay (Speed-oligo Direct *Mycobacterium tuberculosis* [SO-DMT]; Vircell SL, Santa Fe, Granada, Spain) in the direct molecular detection of mycobacteria in respiratory specimens. This molecular assay is based on PCR technology combined with a dipstick to detect the presence of *Mycobacterium* and specifically to identify MTC in clinical respiratory specimens. It may represent a fast and easy alternative for differentiating between MTC and NTM in direct samples at laboratories with standard

laboratory equipment (thermocycler and thermoblock). The applicability of the assay for routine mycobacterium laboratory testing is discussed.

(Part of this study was presented in poster form at the ECC-MID meeting held in Milan, Italy, from 7 to 10 May 2011.)

MATERIALS AND METHODS

Study design. For the validation of the assay in a blind trial, it was evaluated in two stages: first, in a selection of acid-fast bacillus (AFB) smear-positive respiratory specimens (convenience samples) under experimental conditions, and second, in the routine workflow at two different laboratories (prospective evaluation).

Studies were also performed with aliquots from a pool of sputa from patients with no mycobacterial disease which were artificially inoculated with different mycobacterium-related organisms.

Set A. Set A was comprised of 20 respiratory specimens, specifically bronchoalveolar and nasal lavage fluids from pediatric patients with no mycobacterial disease.

Set B. Set B was comprised of 44 selected respiratory smear-positive specimens with different AFB loads (AFB/field, $\times 200$ magnification),

Received 16 July 2012. Returned for modification 21 August 2012.

Accepted 10 October 2012.

Published ahead of print 24 October 2012.

Address correspondence to Miguel José Martínez-Lirola, miguelj.martinez.lirola.sspa@juntadeandalucia.es.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.00533-12

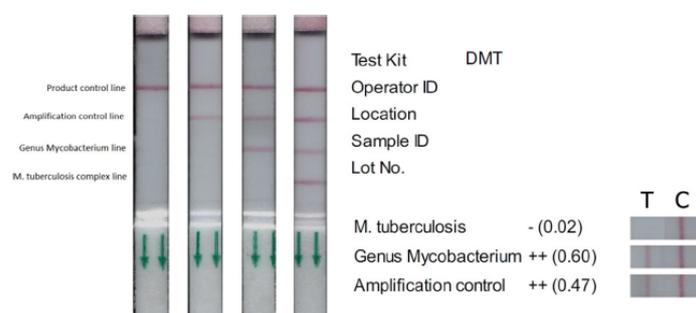


FIG 1 Automatic reading and interpretation of dipstick results after 5 min of incubation. T, test line; C, control line.

scored as 1+ (less than 1:13), 2+ (1:10 to 10:10), 3+ (10:8 to 100:8), and 4+ (more than 100:13), from 29 patients with pulmonary *Mycobacterium* disease under treatment at Torrecárdenas Hospital (Almería, Spain).

Twenty-four specimens were from 17 TB patients, 21 MTC culture-positive and 3 culture-negative specimens were collected from patients under therapy, and 20 NTM culture-positive specimens were from 12 patients fulfilling the criteria for NTM lung disease (14).

Set C. To assess the specificity of the assay, set C was comprised of 11 aliquots from a pool of smear- and culture-negative sputa that were artificially inoculated with 11 different mycobacterium-related organisms supplied by the Instituto Valenciano de Microbiología (IVAMI): *Corynebacterium amycolatum* IVAMI 4023656, *C. xerosis* NCTC 7243, *Streptomyces ambifaciens* IVAMI 4021542, *S. gardneri* IVAMI 4022939, *S. sampsonii* IVAMI 4023161, *Nocardia brasiliensis* NCTC 10300, *N. asteroides* IVAMI 4022938, *N. farcinica* IVAMI 4016593, *N. nova*, *Rhodococcus equi* CECT 555, and *Propionibacterium acnes* IVAMI 4023683.

Routine specimens. SO-DMT and culture were used to prospectively assay 566 fresh respiratory specimens from 460 patients suspected of having mycobacterial disease and included the following: 495 expectorated sputa, 38 bronchial aspirates, 9 bronchoalveolar lavages, and 21 gastric aspirates. This sample comprises specimens processed at mycobacterium reference laboratories (MRLs) in two different hospitals: Carlos Haya University Hospital (Malaga, Spain), which tested 317 specimens from 261 patients between March and June 2011, and Virgen de las Nieves University Hospital (Granada, Spain), which tested 249 specimens from 199 patients between April and June 2011.

These centers are localized in the Mediterranean coastal area of south-east Andalusia, opposite the Morocco coast. The mean annual rate of respiratory TB in Andalusia was 8.49 per 100,000 inhabitants in 2010 (http://revistas.isciii.es/bes/public/journals/1/pdf_69.pdf), and a high percentage of the cases involved individuals from north and sub-Saharan Africa (15). However, the true incidence of other mycobacterioses is unknown because NTM is not a reportable disease in Spain.

Specimen processing, microscopy, culture, and storage conditions. Respiratory specimens were decontaminated, directly examined (with auramine O), and cultured by following standard protocols (16, 17). Mycobacteria were identified by the GenoType mycobacterium CM/AS assay (Hain Lifescience, Nehren, Germany) or AccuProbe hybridization probes (Gen-Probe Inc., San Diego, CA). At least one aliquot of all decontaminated specimens was maintained for a maximum of 7 days at 4°C until assayed with SO-DMT; if the assay procedure was delayed, samples were frozen at -80°C until their analysis.

SO-DMT assay. The SO-DMT assay was carried out by previously trained technicians in two different centers. Positive and negative controls were always included in each test run. The SO-DMT comprises four steps: DNA extraction, amplification, PCR product detection, and result reading, as detailed below.

DNA is extracted from a previously concentrated decontaminated

sample using the reagents included in the kit according to the manufacturer's instructions. Invalid assay results (absence of the human amplification control line) are usually obtained from specimens with a volume of <200 μ l. Sample preparation of a set of 12 specimens takes approximately 45 min.

DNA amplification is performed with 10 μ l of disrupted sample supernatant and 15 μ l of the ready-to-use PCR mix. The amplification process is a multiplex PCR in which a triple target is amplified. DNA extraction is controlled by amplification of the human gene *RNase P*, which is also used to control for the presence of PCR inhibitors. The presence of *Mycobacterium* is assayed by amplifying a fragment of the 16S rRNA sequence and the presence of MTC members by amplifying a fragment of the insertion sequence IS6110. DNA amplification was performed using a standard thermocycler and took 1 h to complete.

A dipstick with probes bound to colloidal gold and to the membrane is used for PCR product detection. The PCR product is denatured for 2 min and added to a preheated running solution in a thermoblock. After introduction of the dipstick and a 5-min incubation period, the result is obtained from the presence of visible lines by using an automatic reading system. In our study, the results interpretation was performed automatically by the software according to the intensity of the line, but a visual interpretation is also possible based on the presence or absence of the red color on control and test lines (Fig. 1). The dipstick has four lines: a product control line, a PCR amplification control line, a test line for the whole *Mycobacterium* genus, whose presence in the absence of the *M. tuberculosis* complex line indicates the presence of NTM genetic material, and a test line for MTC members. In our present experience with this assay, the turnaround time was about 2 h (45 min for DNA extraction, 60 min for DNA amplification, and 10 min for PCR detection).

Data analysis and resolution of discrepancies. Smear microscopy was used for the initial assessment of the *Mycobacterium* load on specimens. Conventional culture was selected as the gold standard for initial assessment of the test performance because of the lower sensitivity of AFB smear examination (18, 19). When discrepancies were observed between the results of direct molecular and microbiological methods, the SO-DMT assay was repeated, and all available clinical, radiological, and smear data were taken into account to classify the patient as clinically positive or clinically negative for TB or NTM (14). A patient was considered clinically positive when (i) clinical symptoms (based on X-ray or TB-specific therapy) were recorded in the medical record or (ii) a positive mycobacterial culture result was available for the same episode. A patient was considered clinically negative when the lung symptoms were compatible but there was no history of *Mycobacterium* infection or recent positive TB or NTM culture findings (20). To minimize false-negative microscopic examinations, smear-negative results of culture-positive specimens were reanalyzed using a new auramine-stained smear of the stored specimens for examination by a second specially trained technician.

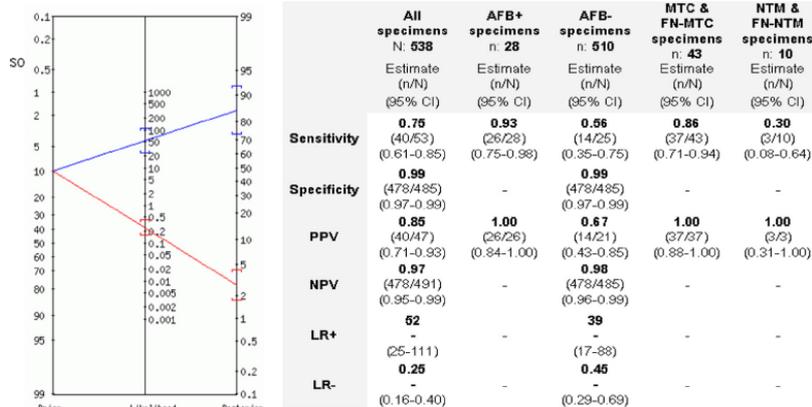


FIG 2 Sensitivity, specificity, predictive values, likelihood ratios, and pre- and posttest probabilities of mycobacterial disease for the SO-DMT system in routine samples. SO-DMT assay results for all specimens were the following: prior probability (odds), 10% (0.1); positive likelihood ratio (LR+) of SO-DMT positive test, 52 (95% CI, 25 to 111); posterior probability (odds), 85% (5.7) (95% CI, 73 to 92%); negative likelihood ratio (LR-) for the SO-DMT negative test, 0.25 (95% CI, 0.16 to 0.40); posterior probability (odds), 3% (0.0) (95% CI, 2 to 4%).

Statistical analysis. The concordance correlation coefficient kappa was used to evaluate the degree of agreement. When evaluating the cumulative results of the SO-DMT assay in the specimens received from each patient, correlation was considered when molecular assay and culture results matched for all specimens from the patient or when an initial discrepancy was resolved by reviewing the patient's clinical records. The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), positive and negative likelihood ratios (LR+ and LR-), and positive and negative posttest probabilities of the molecular assay were calculated with a 95% confidence interval (CI) using the Diagnostic Test Calculator (http://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php) and VassarStats Calculator1 (<http://faculty.vassar.edu/lowry/vsclin.html>) for the data analyses.

RESULTS

Convenience samples. (i) SO-DMT assay of AFB- and culture-negative specimens (set A). The SO-DMT showed no reactivity in any of the 20 *Mycobacterium*-free specimens (absence of MTC and *Mycobacterium* genus test lines and presence of amplification control line).

(ii) SO-DMT assay of AFB- and culture-positive specimens (set B). Compared to culture, the overall sensitivities of the selected smear-positive specimens were 0.91 (95% CI, 0.77 to 0.97) (22/24 MTC and 18/20 NTM) and 0.97 (95% CI, 0.81 to 1.00) for strong positives, 0.77 (95% CI, 0.46 to 0.94) for weak positives, 0.92 (95% CI, 0.72 to 0.99) for MTC, and 0.90 (95% CI, 0.69 to 0.98) for NTM. There was no molecular detection of NTM in a TB case or vice versa.

(iii) SO-DMT assay of specimens with *Mycobacterium*-related organisms (set C). The SO-DMT showed no reactivity with any of the *Mycobacterium*-related strains tested.

Routine sample. (i) AFB examination and culture results. The results of the two laboratories were grouped together for the assay evaluation.

Out of the 566 specimens, 28 (4.9%) were AFB smear positive; 13 (2.3%) were strongly positive and 15 (2.7%) were weakly positive.

According to the culture results, 46 (8.1%) were positive [37 [6.5%] for MTC and 9 [1.6%] for NTM), 492 (87.0%) were negative, and 28 (5.2%) became contaminated with saprophytic flora. Culture cross-contamination was not detected.

Out of the 492 culture-negative specimens, 7 were considered false negatives after a review of the patients' clinical records and other mycobacterial cultures, including 3 AFB smear-negative specimens from TB patients with other MTC-positive specimens from the same episode, 3 AFB smear-positive specimens collected from patients under TB therapy, and 1 smear-positive specimen from a patient with other NTM-positive cultures during the same episode.

All 7 false negatives were considered true-positive cultures (6 for MTC and 1 for NTM) in the SO-DMT assay evaluation, giving a total of 53 culture-positive specimens (43 [7.6%] MTC and 10 [1.8%] NTM culture positives) (Fig. 2 and Table 1).

TABLE 1 Direct examination and *Mycobacterium* culture results for the routine workflow specimens

| Culture type | AFB result | | | Total |
|------------------|------------------|----------------|-----------------|------------|
| | Negative | Weak positive | Strong positive | |
| MTC | 19 | 12 | 12 | 43 |
| NTM | 6 | 3 | 1 | 10 |
| NEG ^c | 485 ^a | 0 ^b | 0 | 485 |
| Contaminated | 28 | 0 | 0 | 28 |
| Total | 538 | 15 | 13 | 566 |

^a Including three AFB and *Mycobacterium* culture-negative specimens from TB patient with other MTC-positive specimens in the same episode.

^b Three of the AFB-positive and culture-negative specimens were obtained from TB patients under therapy, and one was from a patient with other NTM-positive cultures in the same episode. Culture-negative results of 7 specimens were considered false negatives (6 MTC, 1 NTM) for the SO-DMT assay evaluation because they were obtained from clinically positive patients.

^c NEG, absence of mycobacterial growth.

TABLE 2 Comparison of SO-DMT assay results to smear and culture results

| AFB smear test result | SO-DMT positive (<i>n</i> = 47) | | | SO-DMT negative (<i>n</i> = 491) | | |
|-----------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------------|-----------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| | No. MTC assay and culture positive | No. NTM assay and culture positive | No. culture negative | No. with MTC positive culture | No. with NTM positive culture | No. with negative culture |
| Negative | 13 | 1 | 7 | 6 | 5 | 478 |
| Weak positive | 12 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| Strong positive | 12 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total | 37 | 3 | 7 ^a | 6 | 7 | 478 |

^a SO-DMT was positive for MTC in 1 specimen and for NTM in 6 specimens.

Out of the 460 patients in the study, 18 (3.9%) were AFB smear positive and 34 (7.4%) had one or more positive mycobacterium cultures (28 [6.1%] MTC positive and 6 [1.3%] NTM positive). The NTM species isolated in these six patients were *M. avium* (*n* = 2), *M. fortuitum* (*n* = 2), *M. kansasii* (*n* = 1), and *M. abscessus* (*n* = 1). One (0.2%) TB patient under therapy had a single AFB smear-positive and culture-negative specimen.

Specimens from 406 (88.3%) patients were all AFB smear and culture negative (one cultured specimen from some of these patients was contaminated). All specimens from the remaining 19 (4.1%) patients were AFB smear negative, and the cultures were contaminated with saprophytic flora.

(ii) SO-DMT assay results for specimens in routine workflow. In the direct comparison between culture and SO-DMT results, 28 specimens from clinically negative patients were excluded because the culture was contaminated and specimens had always produced a negative SO-DMT result. Among the remaining 538 specimens, the SO-DMT results were negative in 491 specimens, positive for MTC in 38 specimens, and positive for NTM in 9 specimens (Table 2).

In the detection of *Mycobacterium* in the 538 evaluated specimens, the SO-DMT assay showed a sensitivity of 0.75 (40/53) (95% CI, 0.61 to 0.85), specificity of 0.99 (478/485) (0.97 to 0.99), PPV of 0.85 (40/47) (0.71 to 0.93), NPV of 0.97 (478/491) (0.95 to 0.99), prior probability (odds) of 10% (0.1), LR+ of 52 (25 to 111), positive posterior probability (odds) of 85% (5.7), LR- of 0.25 (0.16 to 0.40), and negative posterior probability (odds) of 3% (0.0) (Fig. 2).

A total of 28 specimens were AFB smear positive. In this group, the sensitivity of the SO-DMT was 0.93 (26/28) (CI, 0.75 to 0.98), and the PPV was 1.00 (26/26) (0.84 to 1.00) (Fig. 2). The sensitivity was 1.00 (13/13) (0.72 to 1.00) and the PPV was 1.00 (13/13) (0.72 to 1.00) in the AFB strongly positive subgroup, while the sensitivity was 0.86 (13/15) (0.56 to 0.97) and PPV 1.00 (13/13) (0.70 to 1.00) in the AFB weakly positive subgroup.

In the 510 smear-negative specimens, the SO-DMT showed a sensitivity of 0.56 (14/25) (0.35 to 0.75), specificity of 0.99 (478/485) (0.97 to 0.99), PPV of 0.67 (14/21) (0.43 to 0.85), and NPV of 0.98 (478/485) (0.96 to 0.99) (Fig. 2).

In the 43 specimens with the presence of MTC species, the assay showed a sensitivity for MTC identification of 0.86 (37/43) (0.71 to 0.94) and PPV of 1.00 (37/37) (0.88 to 1.00) (Fig. 2).

In the 10 specimens (9 NTM positive and 1 false-negative NTM) showing the presence of *Mycobacterium* species, the assay showed a sensitivity for NTM detection of 0.30 (3/10) (CI, 0.08 to 0.64) and a PPV of 1.00 (3/3) (0.31 to 1.00) (Fig. 2).

(iii) SO-DMT assay results in routine workflow specimens. Considering cumulative SO-DMT results in the specimens from each patient, the concordance between SO-DMT assay results and culture-confirmed and/or clinically diagnosed mycobacterial lung disease was 97.8, with a Cohen's kappa index of 0.85 (standard error, 0.0475), indicating excellent concordance. The correlation (% concordance) between SO-DMT assay results and clinically and/or microbiologically confirmed findings for mycobacterial disease was 100% (18/18) in the smear-positive patients (17 TB and 1 clinical NTM lung disease cases), 65% (13/20) in the smear-negative patients (80% [12/15] in TB cases and 20% [1/5] in NTM culture-confirmed and/or clinically diagnosed cases), and 92.2% (400/403) in the patients without NTM or MTC. In four patients, three with TB and another one fulfilling the criteria for NTM lung disease, the SO-DMT assay failed to detect any mycobacterium in some of the culture-positive specimens tested, but these were considered concordant cases for this analysis.

(iv) Discrepancies between SO-DMT assay results and clinically and/or microbiologically confirmed TB or mycobacterial lung disease. There were 14 specimens with initially divergent results. In four of these cases, the discrepancy was resolved by retesting and identifying technical errors in the SO-DMT assay performance (*n* = 2), by finding positive mycobacterial cultures in another specimen(s) from the same episode not included in this study, and/or by reclassifying the clinical diagnosis after a review of the patient's medical records (*n* = 2). In the remaining 10 specimens from 10 patients, the SO-DMT assay result differed from the clinical and/or microbiological findings on the presence of mycobacterial disease. Discrepancies were the following: (i) SO-DMT negative both in 1 patient with TB and in 4 NTM culture-positive patients with or without confirmed lung disease; (ii) in 3 cases the molecular test was positive for *Mycobacterium* spp. in culture-negative and clinically negative patients; and (iii) two cases were positive for *Mycobacterium* spp. by SO-DMT of TB patients. The latter discrepancies occurred when testing two gastric aspirates from two children with clinically but not microbiologically confirmed lung TB; both resulted from domestic contacts with different confirmed lung TB cases.

DISCUSSION

In a convenience sample of preselected specimens with different AFB loads, the molecular assay was able to efficiently detect and classify MTC and NTM specimens. Three out of the four false negatives had a low bacterial load (1 to 10 AFB/10 fields), and the two false negatives were for specimens with NTM. *M. goodii* was present in one of these, but the smear microscopy study revealed it to be a paucibacillary sample, probably below the assay

detection limit. *M. intracellulare* was present in the other false-negative specimen that produced a test line signal level below the automatic reading cutoff limit recommended by the manufacturer, although a faint color was visible on the *Mycobacterium* genus test line.

In the routine specimens, a good correlation was found between smear microscopy and SO-DMT results. The sensitivity of the assay was very satisfactory in AFB smear-positive specimens and correctly classified samples as MTC or NTM in all cases. The sensitivity was lower (56.6%) in AFB smear-negative samples within the range previously reported for smear-negative samples (21, 22). The overall specificity was very high. The sensitivity for specimens with NTM species was low (3/10), probably because there is only one copy number of the amplified target. In fact, the overall sensitivity of the *Mycobacterium* genus line was relatively weak in the routine specimens, likely because this sample contained six smear-negative NTM samples but only one that was strongly smear positive. A weakness of the present study was the low prevalence of NTM-positive specimens in the routine workflow series. Four of the false negatives were obtained from a single patient with *M. avium* infection for whom no other positive cultures were available to identify any genetic variant that might have interfered with the amplification or detection processes of the assay, and no other molecular method was available for the direct detection of *M. avium*. In contrast, the assay detected 18 out of 20 smear-positive NTM samples in the convenience sample. Assay results and clinical data showed a concordance of 100% in smear-positive cases, 65% in smear-negative cases, and 99.2% in clinically negative cases.

No cross-reactions were detected in assays of different mycobacterium-related organisms (convenience sample), and the specificity of the assay in all study samples was very high (99%), demonstrating that the test is useful to correctly differentiate between MTC and NTM in smear microscopy-positive samples and that there is a very low likelihood of a false-positive result with this system. However, five discrepancies between the assay and clinical data could not be resolved. Out of these, three samples were reproducibly positive for the *Mycobacterium* genus test line but the *Mycobacterium* cultures were negative. One explanation is the presence of contaminant *Mycobacterium* DNA that could not be recovered by standard culture methods due to the impaired viability of the organisms (23). Additionally, a negative assay result in a culture-positive specimen may have various explanations: the presence of a low number of bacteria or strains of MTC (notably *M. bovis*) having a low number of copies of IS6110, the unequal distribution of mycobacteria in the specimen, or deficient lysis of the mycobacterial wall. According to the kit manufacturer, the analytical sensitivity of the assay was determined with serial dilutions of *M. tuberculosis* H37Rv purified DNA, demonstrating an ability to detect up to 2 genome copies per reaction on the *M. tuberculosis* complex test line and 20 genome copies per reaction on the *Mycobacterium* genus test line.

Several commercially available nucleic acid amplification tests have been extensively evaluated for the detection of MTC species in respiratory samples, showing high specificity and good positive predictive values for smear-positive samples and variable sensitivity for smear-negative and extrapulmonary TB samples (22–25). However, most of these tests require the use of real-time PCR or precision instruments that are not affordable in many countries with a high TB burden, or they involve technologies that require

extensive hands-on time. In contrast, the SO-DMT assay combines a PCR amplification method with a simple detection procedure that does not require long postamplification preparation or exclusive equipment, reducing manipulation to only two pipetting steps. As limitations, assay automation is not possible and separate laboratory areas should be used for specimen preparation, target amplification, and amplicon detection. In conclusion, the SO-DMT assay requires only 30 min of hands-on time and offers a total turnaround time of 2 h from sample reception. It directly detects *Mycobacterium* species in a clinical specimen and simultaneously differentiates them from MTC species. Results obtained in a convenience sample of AFB smear-positive specimens suggest that utilization of this assay for MTC/NTM detection and differentiation can avoid the need to wait for culture results from smear-positive samples. This is an important benefit for case management and contact investigation, making the assay especially valuable for clinicians in countries with a high incidence of NTM.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Juan García de Lomas for providing mycobacterium-related organisms from the Instituto Valenciano de Microbiología (IVAMI) and to the personnel in the clinical mycobacteriology laboratories of H. Carlos Haya, H. Virgen de las Nieves, and C. H. Torrecárdenas and to the research group of tuberculosis at Almería CTS626 (IndalTB) for their collaboration.

SO-DMT kits used in this study were a gift of Vircell SL, Granada, Spain, of which P. Mendoza-Lopez is an employee.

All authors voluntarily publish this article and have no personal interest in this study other than publishing the scientific findings that they have been involved in via planning, setting up, assaying, and analyzing the results. M.J.M.-L. designed the study and was responsible for the first draft of the manuscript, which was then substantially revised by all authors.

The study was partially financed by Junta de Andalucía (PI-0444/2008 and PI-0306-2009) and SEPAR (763-09).

REFERENCES

- Farmer P, Bayona J, Becerra M, Furin J, Henry C, Hiatt H, Kim JY, Mitnick C, Nardell E, Shin S. 1998. The dilemma of MDR-TB in the global era. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2:869–876.
- Jarzebowski JA, Young MB. 2008. Nontubercular mycobacterial infections. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 132:1333–1341.
- Van Rie A, Enarson D. 2006. XDR tuberculosis: an indicator of public-health negligence. *Lancet* 368:1554–1556.
- Lebrun L, et al. 2005. Use of the INNO-LiPA-Mycobacteria assay (version 2) for identification of *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare*-*Mycobacterium scrofulaceum* complex isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43:2567–2574.
- Musial CE, Tice LS, Stockman L, Roberts GD. 1988. Identification of mycobacteria from culture by using the Gen-Probe Rapid Diagnostic System for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.* 26:2120–2123.
- Quezel-Guerraz NM, Arriaza M, Avila JA, Sanchez-Yebra Romera WE, Martinez-Lirola MJ. 2010. Evaluation of the Speed-oligo mycobacteria assay for identification of *Mycobacterium* spp. from fresh liquid and solid cultures of human clinical samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 68:123–131.
- Ruiz P, Gutierrez J, Zerolo FJ, Casal M. 2002. GenoType mycobacterium assay for identification of mycobacterial species isolated from human clinical samples by using liquid medium. *J. Clin. Microbiol.* 40:3076–3078.
- Said HM, Ismail N, Osman A, Velsman C, Hoosen AA. 2011. Evaluation of TBc identification immunochromatographic assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex in samples from broth cultures. *J. Clin. Microbiol.* 49:1939–1942.
- Tortoli E. 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:319–354.
- Barber R. 2008. Evaluation of the BD ProbeTec ET system for the direct

- detection of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical samples. *Br. J. Biomed. Sci.* 65:7–12.
11. Couto I, Machado D, Viveiros M, Rodrigues L, Amaral L. 2010. Identification of nontuberculous mycobacteria in clinical samples using molecular methods: a 3-year study. *Clin. Microbiol. Infect.* 16: 1161–1164.
 12. Kiraz N, Saglik I, Kiremitci A, Kasifoglu N, Akgun Y. 2010. Evaluation of the GenoType Mycobacteria Direct assay for direct detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex obtained from sputum samples. *J. Med. Microbiol.* 59:930–934.
 13. Dorman SE. 2010. New diagnostic tests for tuberculosis: bench, bedside, and beyond. *Clin. Infect. Dis.* 50(Suppl. 3):S173–S177.
 14. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Iademarco MF, Iseman M, Olivier K, Ruoss S, von Reyn CF, Wallace RJ, Jr, Winthrop K, ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee, American Thoracic Society, Infectious Disease Society of America. 2007. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175:367–416.
 15. Martinez-Lirola M, Alonso-Rodriguez N, Sánchez ML, Herranz M, Andrés S, Peñafiel T, Rogado MC, Cabezas T, Martínez J, Lucerna MA, Rodríguez M, Bonillo Mdel C, Bouza E, García de Viedma D. 2008. Advanced survey of tuberculosis transmission in a complex socioepidemiologic scenario with a high proportion of cases in immigrants. *Clin. Infect. Dis.* 47:8–14.
 16. 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.
 17. Pfyffer G, Frantiska P. 2011. Mycobacterium: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. In Versalovic J, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock D (ed), *Manual of clinical microbiology*, 10th ed. ASM Press, Washington, DC.
 18. Daley P, Thomas S, Pai M. 2007. Nucleic acid amplification tests for the diagnosis of tuberculous lymphadenitis: a systematic review. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 11:1166–1176.
 19. Peterson EM, Nakasone A, Platon-DeLeon JM, Jang Y, de La Maza LM, Desmond E. 1999. Comparison of direct and concentrated acid-fast smears to identify specimens culture positive for *Mycobacterium* spp. *J. Clin. Microbiol.* 37:3564–3568.
 20. Crudu V, Stratan E, Romancenco E, Allerheiligen V, Hillemann A, Moraru N. 2012. First evaluation of an improved assay for molecular genetic detection of tuberculosis as well as rifampin and isoniazid resistances. *J. Clin. Microbiol.* 50:1264–1269.
 21. CDC. 2009. Update guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 58:7–10.
 22. Ling DI, Flores LL, Riley LW, Pai M. 2008. Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: meta-analysis and meta-regression. *PLoS One* 3:e1536. doi:10.1371/journal.pone.0001536.
 23. Peter-Getzlaff S, Luthy J, Voit A, Bloemberg GV, Bottger EC. 2010. Detection and identification of *Mycobacterium* spp. in clinical specimens by combining the Roche Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* assay with *Mycobacterium* genus detection and nucleic acid sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 48:3943–3948.
 24. Hernandez Abanto SM, Hirata MH, Hirata RD, Mamizuka EM, Schmal M, Hoshino-Shimizu S. 2000. Evaluation of Henes-PCR assay for *Mycobacterium* detection in different clinical specimens from patients with or without tuberculosis-associated HIV infection. *J. Clin. Lab. Anal.* 14:238–245.
 25. Piersimoni C, Scarparo C, Piccoli P, Rigon A, Ruggiero G, Nista D, Bornigia S. 2002. Performance assessment of two commercial amplification assays for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex from respiratory and extrapulmonary specimens. *J. Clin. Microbiol.* 40: 4138–4142.

